

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biitekniikka

2016

Erika Tulla

VASTA-AINEIDEN LEIMAUSPROSESSIN KARAKTERISOINTI BORAATTIPUSKURIN KORVAAMISEKSI



Erika Tulla

VASTA-AINEIDEN LEIMAUSPROSESSIN KARAKTERISOINTI BORAATTIPUSKURIN KORVAAMISEKSI

Opinnäytetyön tarkoituksena oli karakterisoida PerkinElmer Wallac Oy:n vasta-aineiden leimausprosessia ja selvittää leimauspuskurin vaihdon vaikutusta prosessiin. Leimauspuskurina käytettävä boraattipuskuri haluttiin korvata, sillä se saattaa heikentää hedelmällisyyttä ja vaurioittaa sikiötä. Boraattipuskurin valmistukseen käytettävät boraatit kuuluvat Euroopan kemikaaliviraston kandidaattiluetteloon, josta ne ollaan mahdollisesti siirtämässä myös luvanvaraisten aineiden listalle.

Boraattipuskurille etsittiin sopivan rakenteen ja pH-alueen omaava puskurivaihtoehto, jonka toimivuutta testattiin leimaamalla kolme pientä testierää. Puskurin vaihdon lisäksi karakterisoitiin puskurin pitoisuuden ja suolapitoisuuden vaikutusta vasta-aineiden leimautumiseen. Testierille tehtiin normaalit laadunvalvontatestit, joissa tarkasteltiin leimausastetta ja standardien pitoisuuksia. Kombinaatiotestien avulla testattiin, toimivatko valmistetut testileimat yhdessä muiden kittikomponenttien kanssa. Testileimoista valittiin yksi, jolle tehtiin kiihdytetty säilyvyystestaus, jonka avulla selvitettiin, onko leimauspuskurin vaihto vaikuttanut leimakomponentin säilyvyyteen. Lisäksi tutkittiin nestekromatografi-massaspektrometri-laitteistolla testattavan leimauspuskurin reaktiivisuutta leimana käytettävän Eu-N¹-ITC-kelaatin kanssa.

Prosessinaikaisessa laadunvalvonnassa saadut tulokset osoittivat, että puskurin vaihto ei ole vaikuttanut vasta-aineiden leimautumiseen. Kombinaatiotestien ja kiihdytetyn säilyvyystestauksen tulokset olivat myös hyväksymisrajoissa, mikä osoittaa, että valmistetut leimaerät toimivat muiden kittikomponenttien kanssa normaaliin tapaan, eikä leimauspuskurin vaihto ole vaikuttanut leimakomponentin säilyvyyteen. UPLC-MS-määrityksen perusteella havaittiin, että puskuri ja kelaatti reagoivat hieman keskenään. Reagoimista ei tapahdu kuitenkaan niin paljon, että se vaikuttaisi vasta-aineiden leimautumiseen. Karakterisoinneissa saatujen tulosten perusteella voidaan todeta, että valittu puskuri toimii vasta-aineiden leimausprosessissa muuttamatta itse prosessia tai tuotetta. Projekti jatkuu validointisuunnitelman laatimisella ja validoinnin toteutuksella.

ASIASANAT:

karakterisointi, luvanvarainen aine, leimauspuskuri, boraatti, vasta-aine

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2016 | 43

Ilari Suominen, Principal lecturer, Turku University of Applied Sciences

Raimo Pärssinen, Principal lecturer, Turku University of Applied Sciences

Veli-Matti Mukkala, Process Specialist, PerkinElmer Wallac Oy

Erika Tulla

CHARACTERIZATION OF ANTIBODY LABELLING PROCESS FOR BORATE BUFFER REPLACEMENT

The objective of this thesis was to characterize the antibody labelling process of PerkinElmer Wallac and find out if changing the labelling buffer affects the process. The borate buffer currently used as the labelling buffer needs to be replaced because it may damage fertility and the unborn child. Borates that are used in preparation of the borate buffer are included in the European Chemical Agency's candidate list and can also be added to the Authorisation List.

The alternative for the borate buffer was chosen on the grounds of its structure and pH range. The functionality of the chosen buffer was tested by labelling three small test batches. The effects of the buffer concentration and salt concentration on the labelling of the antibodies were also characterized. Normal in-process control tests were performed on the test batches, whereby the labelling rates and standard concentrations were observed. Combination tests were performed in order to determine if the test tracer would function with other kit components. One test tracer was chosen and further tested in an accelerated stability test to determine if changing the labelling buffer affects the stability of the tracer component. The reactivity between the tested labelling buffer and the Eu-N₁-ITC chelate was also determined by using a liquid chromatography-mass spectrometry apparatus.

In-process control results showed that changing the labelling buffer has not affected the labelling of the antibodies. The results of combination tests and accelerated stability test were also within acceptance limits, which indicates that the test batches function normally with other kit components and changing the labelling buffer does not affect the stability of the tracer component. The UPLC-MS determination showed that there is some reactivity between the buffer and the chelate. However, there is not enough reacting to interfere with the antibody labelling. Based on the results obtained from the characterization it can be found that the chosen buffer functions in the antibody labelling process without changing the process or the product. The project will be continued by preparing a verification plan and carrying out the verification.

KEYWORDS:

characterization, substance subject to authorisation, labelling buffer, borate, antibody

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	6
1 JOHDANTO	8
2 LAADUNHALLINTA	10
2.1 Laadunhallintajärjestelmä	10
2.2 Prosessivalidointi	11
2.3 Kemikaaliturvallisuus ja boraattipuskuri	14
3 DELFIA®-TEKNOLOGIA	17
3.1 Aikaerotteinen fluorometria	17
3.2 Lantanidikelaatit	18
3.3 Immunomääritykset	20
4 VASTA-AINEIDEN LEIMAUS	23
4.1 Leimaukseen vaikuttavat tekijät	23
4.2 Leimausprosessi	25
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	30
5.1 Puskurin valinta	30
5.2 Karakterisointierät	31
5.3 UPLC-MS-määrittäminen	31
5.4 Kombinaatio- ja säilyvyystestit	33
6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	37
6.1 Prosessinaikainen laadunvalvonta	37
6.2 Puskurin ja kelaatin välinen reaktio	38
6.3 Kombinaatiotestit	38
6.4 Säilyvyystestit	39
7 JOHTOPÄÄTÖKSET	40
LÄHTEET	42

LIITTEET

- Liite 1. Riskiarviointi
- Liite 2. Puskurin valinta
- Liite 3. Puskuriliuosten valmistus
- Liite 4. Kantaliuosten valmistus ja pullotus
- Liite 5. Prosessinaikaisen laadunvalvonnan tulokset hyväksymisrajoineen
- Liite 6. UPLC-MS-määritys
- Liite 7. UPLC-MS-määrityksen raakadata
- Liite 8. UPLC-MS-määrityksen tulosten tarkastelu
- Liite 9. Eu-N¹-ITC-kelaatin UV-spektri
- Liite 10. Kombinaatiotestien tulokset hyväksymisrajoineen
- Liite 11. Säilyvyytestin tulokset hyväksymisrajoineen

KUVIOT

Kuvio 1. Prosessivalidoinnin elinkaarimalli.	12
Kuvio 2. Uudelleenvalidointitarve.	14
Kuvio 3. Aikaerotteinen fluorometria.	18
Kuvio 4. Europiumin viritys- ja emissiovalo.	18
Kuvio 5. Fluoresoivan lantanidikelaatin muodostuminen.	19
Kuvio 6. Antigeenin sitoutuminen vasta-aineeseen (IgG).	20
Kuvio 7. Kilpaileva määritys, FIA.	21
Kuvio 8. Ei-kilpaileva määritys, IFMA.	21
Kuvio 9. Leimaukseen vaikuttavat tekijät.	23
Kuvio 10. Kelaatin ITC-ryhmän hajoaminen aminoryhmäksi.	24
Kuvio 11. Vasta-aineiden leimausprosessi.	25
Kuvio 12. Eu-N ¹ -ITC-kelaatti.	26
Kuvio 13. Eu-N ³ -ITC-kelaatti.	27
Kuvio 14. Geelikromatografian periaate.	27
Kuvio 15. Puhdistuksen absorbanssi-/fluoresenssikäyrä.	28
Kuvio 16. Dimeerin muodostuminen.	32
Kuvio 17. Leimausasteen seuranta.	37

TAULUKOT

Taulukko 1. Yhdelmänumerot kombinaatiotesteissä.	34
Taulukko 2. Laadunvalvonnan tulokset.	38

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

CMDCAS	Kanadan lääkinnällisiä laitteita koskevat määräykset (Canadian Medical Devices Conformity Assessment System)
CMR	Syöpää aiheuttava, perimää vaurioittava ja/tai lisääntymiselle vaarallinen aine (Carcinogen, Mutagen and/or Reproductive toxicant)
CPS	Signaalia sekunnissa (Counts Per Second)
DELFI	PerkinElmer Wallac Oy:n määritysmenetelmä, joka perustuu lantanidikelaatteihin ja aikaerotteiseen fluorometriaan (Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassays)
DTPA-puhdistettu BSA	Naudan seerumin albumiini (BSA, Bovine Serum Albumin), josta on poistettu raskasmetallien jäämät dietyleenitriamiinipentaetikkahapon (DTPA) avulla
ECHA	Euroopan kemikaalivirasto (European Chemicals Agency)
EN ISO	Eurooppalaisessa standardisointijärjestössä (CEN) ja kansainvälisessä standardisointijärjestössä (ISO) vahvistettu standardi
FDA	Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkintävirasto (Food and Drug Administration)
FIA	Kilpaileva immunomääritys, jossa merkkiaineena fluorofori (Fluoroimmunoassay)
Herkkyys	Alin määrä analyyttia, joka pystytään havaitsemaan (detection limit)
IFMA	Ei-kilpaileva immunomääritys, jossa merkkiaineena fluorofori (Immunofluorometric assay)
ITC-ryhmä	Isotiosyanaattiryhmä, reagoi proteiinissa aminoryhmien, hydroksyyli-ryhmien ja tioliryhmien kanssa

Leima	Merkkiaine, joka voidaan havaita kemiallisesti tai fysikaalisesti, tässä tapauksessa lantanidikelaatti
Leimaus	Merkkiaineen sitominen vasta-aineeseen
QMS	Laadunhallintajärjestelmä (Quality Management System)
REACH	Kemikaalien rekisteröinti, arviointi, lupamenettelyt ja rajoitukset (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
SVHC	Erityistä huolta aiheuttava aine (Substances of Very High Concern)
VST	Validoinnin ohjausryhmä (Validation Steering Team)

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin toimeksiantona PerkinElmer Wallac Oy:lle. PerkinElmer on kansainvälinen yritys, jonka pääkonttori on Yhdysvalloissa. Yrityksen tavoitteena on parantaa ihmisten ja ympäristön hyvinvointia. Turussa toimiva Wallac Oy kuuluu PerkinElmer-konserniin, ja siellä kehitetään ja valmistetaan laitteita, reagensseja ja ohjelmistoja erityisesti vastasyntyneiden seulontaan. Seulonnan avulla tehdyn diagnoosin perusteella harvinaisia ja vakavia synnynnäisiä sairauksia voidaan hoitaa, minkä avulla voidaan estää vakavien ongelmien synty ja jopa kuolema.¹

Seulontatuotteet perustuvat Wallacissa 1980-luvulla kehitettyyn DELFIA®-tekniikkaan, joka hyödyntää lantanidikelaatteja ja aikaerotteista fluorometriaa. Tekniikka on pysynyt tähän päivään asti periaatteeltaan samana, ja monet opinnäytetyössä käytetyt lähteet ovatkin menetelmän kehittämisajoilta. Opinnäytetyön teoriaosuus käsittelee DELFIA®-tekniikan lisäksi laadunhallintaa ja määrityksissä käytettävien vasta-aineiden leimausprosessia. Opinnäytetyössä karakterisoiitiin edellä mainittua vasta-aineiden leimausprosessia, tavoitteena korvata leimauspuskurina käytettävä boraattipuskuri jollain toisella tarkoitukseen sopivalla puskurilla.

Boraattipuskuri halutaan korvata, sillä sen valmistukseen käytettävät boraatit saattavat heikentää hedelmällisyyttä ja vaurioittaa sikiötä. Aineet ovat työturvallisuudelle riski ja niiden korvaaminen päätettiin aloittaa nyt, sillä Euroopan kemikaalivirasto harkitsee boraattien siirtämistä erityistä huolta aiheuttavien aineiden listalta luvanvaraisten aineiden luetteloon. Mikäli aineet päätyvät kyseiselle listalle, tulee niiden käyttö lopettaa määrättyyn päivään mennessä. Toinen vaihtoehto on hakea käytölle erityislupaa, mutta se on kallis, määräaikainen ja vaatii korvaussuunnitelman.²

Wallac Oy:ssä boorihappoa käytetään siis boraattipuskurin valmistamiseen, joka on vasta-aineiden leimausvaiheessa pH:n säätöön käytetty puskur. Opinnäytetyön tarkoituksena oli löytää leimavalmistuksessa käytettävälle boraattipuskurille korvaava vaihtoehto ja karakterisoida leimavalmistusprosessia puskurin vaihdon osalta. Karakterisoinnin tarkoituksena oli löytää sopiva puskur ja osoittaa, että se toimii tarkoituksenmukaisesti muuttamatta prosessia. Karakterisointi on tiedon keräämistä, jonka perusteella päätetään mahdollisesta validoinnista tai verifioinnista ja niiden toteutuksesta.

Puskurivaihtoehdot valittiin niiden kemiallisen rakenteen, pH-alueen ja turvallisuuden perusteella. Karakterisointierissä tutkittiin muun muassa puskurin pitoisuuden ja suolapitoisuuden vaikutusta. Havainnot ja tulosten tulkinta tehtiin prosessinaikaisen laadunvalvonnan, nestekromatografi-massaspektrometri-määrittelyn sekä kombinaatio- ja säilyvyystestien perusteella. Työ tehtiin noudattaen Wallac Oy:n laatukäsikirjaa, prosessivalidoinnin ohjeistuksia sekä yleisiä menettely- ja valmistusohjeita. Kaikki toiminta dokumentoitiin ja arkistoititiin. Liitteisiin on koottu kaikki luottamuksellinen materiaali.

2 LAADUNHALLINTA

Tässä osiossa on esitelty lyhyesti Wallacin laadunhallintajärjestelmä ja prosessivalidoinnin merkitys laadunhallinnassa. Laadunhallintajärjestelmä ja prosessivalidoinnin periaatteet luovat toimintamallit tässä opinnäytetyössä suoritetulle prosessin karakterisoinnille. Osion lopussa tarkastellaan vielä tarkemmin kemikaaliturvallisuutta ja sitä kautta tämän opinnäytetyön lähtökohtaa ja tavoitetta.

2.1 Laadunhallintajärjestelmä

Wallacin laadunhallinta koostuu useista prosesseista, jotka on kuvattu laatukäsikirjassa. Tämän laadunhallintajärjestelmän (QMS) tavoitteena on varmistaa, että tuotteet ja palvelut ovat turvallisia ja täyttävät kaikki asiakkaiden ja viranomaisten niille asettamat vaatimukset.³ Laatutavoitteiden täyttymistä seurataan jatkuvasti ja toimintaa pyritään aktiivisesti parantamaan.

Wallacin laadunhallintajärjestelmä noudattaa amerikkalaisen FDA:n laatujärjestelmäsäädöksiä, EN ISO 9001:2008- ja EN ISO 13485:2012-laadunhallintajärjestelmästandardeja, 13485:2003 standardia CMDCAS -säännöksen alla ja Euroopan IVD 98/79/EY -direktiiviä.³ Laadunhallintajärjestelmä toimii lähtökohtana kaikille Wallac Oy:ssä käytettäville menettelyohjeille ja työohjeille. (Henkilökohtainen tiedonanto, Ann-Christine Fagerström ja Heli Sahlberg, 25.11.2015) Myös prosessivalidointi ja siihen kuuluva karakterisointi tehdään laadunhallintajärjestelmää, menettelyohjeita ja työohjeita noudattaen.

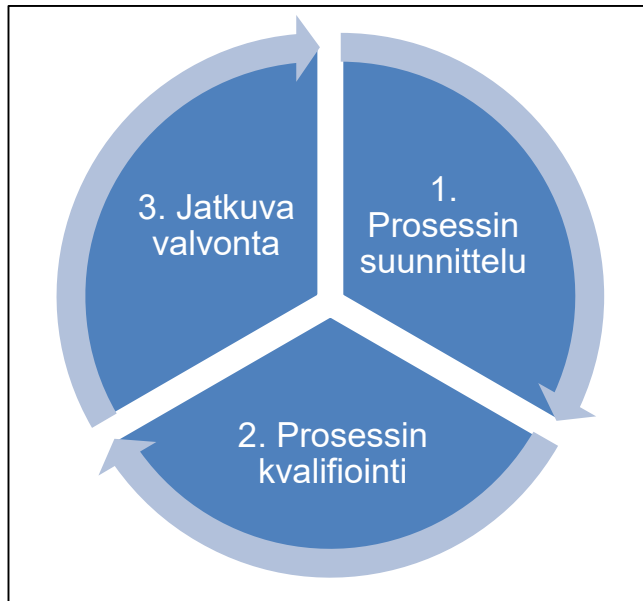
Laadunhallintaan kuuluu useita eri osa-alueita: muutostenhallinta, dokumenttien ja tallenteiden hallinta, riskienhallinta, resurssien hallinta sekä tuotehallinta. Muutostenhallinnan tarkoituksena on varmistaa, että kaikki tuotteisiin, prosesseihin, menettelyihin tai laatutallenteisiin kohdistuvat muutokset täyttävät sekä liiketaloudelliset että viranomaisien vaatimukset. Muutostenhallinta koskee koko tuotteen elinkaarta. Muutostenhallintaan kuuluu muutoksen syyn arviointi, riskien arviointi sekä muutoksen vaikutuksen arviointi. Arvioinnin perusteella suunnitellaan, miten muutos toteutetaan. Prosessivalidoinnissa tämä näkyy selvimmin riskiarvioinnin laatimisena. Riskienhallinta on myös oma prosessinsa ja siihen kuuluu riskien arviointi, riskien valvonta ja tiedonkeruu. Dokumenttien ja tallenteiden hallinnan tarkoitus on varmistaa, että Wallacin dokumentit noudatta-

vat viranomaisvaatimuksia ja kansainvälisiä laatustandardeja. Oikeanlaisen dokumentoinnin avulla varmistetaan ja osoitetaan objektiivisesti, että yhtiö toimii viranomaisvaatimusten, kansainvälisten laatustandardien sekä Wallacin omien prosessi-, toiminta- ja työohjeiden mukaan. Tallenteiden hallinnan avulla varmistetaan, että tallenteet säilyvät ja ovat saatavilla riittävän kauan. Kaikki dokumentit, kuten tässä opinnäytetyössä tehdyn karakterisoinnin dokumentit arkistoitiiin Wallacin menettelyohjeiden mukaisesti, jotta edellä mainitut tavoitteet täyttyisivät. ³

2.2 Prosessivalidointi

Prosessivalidointi on tärkeä osa laadunhallintaa. Se voidaan suorittaa uutta prosessia luotaessa tai uudelleenvalidointina, kun jo validiin prosessiin tulee muutos. Kaikki tuotteiden valmistukseen liittyvät prosessit, joita ei täydellisesti verifioida, tulee validoida, jotta voidaan olla varmoja siitä, että tuotteelle asetetut vaatimukset täyttyvät toistettavasti. Wallacin määritelmä validoinnille on: ”Tutkimukseen ja objektiiviseen näyttöön perustuva varmistuminen siitä, että tiettyä käyttöä koskevat vaatimukset pystytään toistettavasti täyttämään”. Verifiointi taas määritellään seuraavanlaisesti: ”Tarkastukseen ja testaukseen perustuva varmistuminen siitä, että määritellyt vaatimukset on täytetty”. Verifiointin ja validoinnin suurin ero on siinä, että validoinnissa osoitetaan toistettavuus yleensä vähintään kolmella testierällä, kun taas verifiointissa riittää yksi testierä. Sekä validoinnista että verifiointista laaditaan aina suunnitelma ja tulokset raportoidaan viralliseen validointi-/verifiointiraporttiin. Kaikki toiminta dokumentoidaan ja arkistoidaan. Verifiointi voidaan suorittaa, mikäli on riittävät perustelut siitä, että toistettavuudesta voidaan olla varmoja ilman validoinnin suorittamista. ⁴

Prosessivalidointia kuvataan usein elinkaarimallin (*life cycle*) avulla: se on sarja toimintoja, jotka tapahtuvat tuotteen ja/tai prosessin elinkaaren aikana. Tämä elinkaari voidaan jaotella kolmeen vaiheeseen, joista kullakin on omat tehtävänsä ja tavoitteensa, mutta jotka kaikki toimivat yhteisen päämäärän saavuttamiseksi. Yhteisenä päämääränä voidaan pitää sitä, että prosessin tulee tuottaa jatkuvasti ja todistettavasti laatuvaatimukset täyttäviä tuotteita. Dataa kerätään ja arvioidaan koko tuotteen ja prosessin elinkaaren ajan, jotta tämän päämäärän saavuttamisesta voidaan todistettavasti olla varmoja. Elinkaaren vaiheet voidaan jakaa prosessin suunnitteluun, prosessin kvalifiointiin ja sen jatkuvaan valvontaan ⁵ (Kuvio 1). Kvalifioinnilla tarkoitetaan Wallacissa laitteen, tilan tai hyödykkeen validointia ⁴.



Kuvio 1. Prosessivalidoinnin elinkaarimalli.

Prosessin suunnittelu (*Process Design*)

Prosessin suunnitteluvaiheessa on tavoitteena suunnitella prosessi, joka tuottaa jatkuvasti laatuvaatimukset täyttäviä tuotteita. Ennen suunnittelun aloittamista on syytä määrittää prosessiin/tuotteisiin kohdistuvat vaatimukset. Suunnittelun lähtökohtana on asiantuntemus ja tiedonhaku, jotta prosessi tunnetaan mahdollisimman hyvin. Kehitysvaiheessa kerätään tietoa prosessista esimerkiksi karakterisoinnin avulla. Wallacissa karakterisointi määritellään seuraavalla tavalla: "Jos prosessi tai testimenetelmä ei ole tarpeeksi tunnettu, jotta sitä voidaan toistettavasti kontrolloida, se pitää ensin karakterisoida ja optimoida dokumentoitujen tutkimusten perusteella". Saadun tiedon perusteella voidaan määrittää prosessivaiheet, parametrit ja toleranssit. Suunnitteluvaiheessa kerätyn tiedon ja saatujen tulosten perusteella tehdään riskiarviointi ja sitä kautta validointitarpeen arviointi.⁴

Prosessin kvalifointi (*Process Qualification, PQ*)

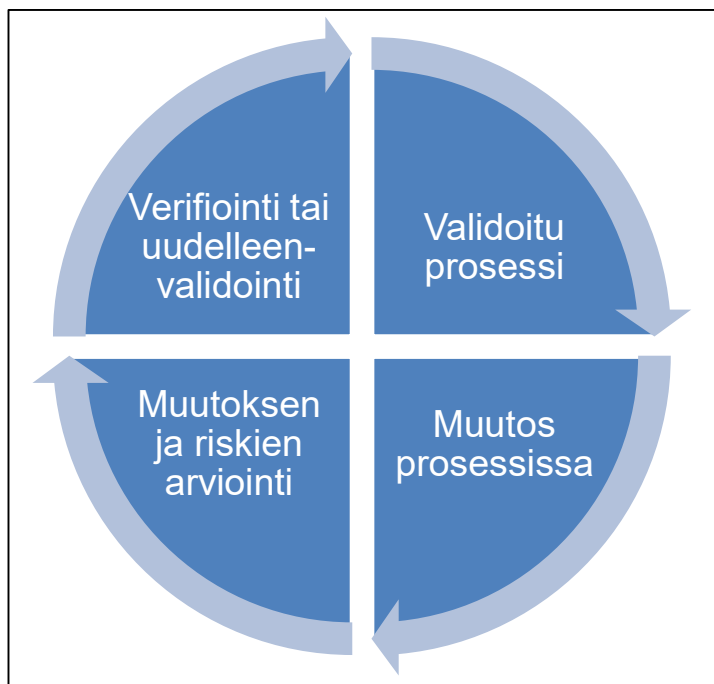
Prosessin kvalifointivaiheen tavoitteena on määrittää, kykeneekö prosessi tuottamaan toistettavasti laatuvaatimukset täyttäviä tuotteita. Kvalifioinnilla tarkoitetaan laitteiden, tilojen ja hyödykkeiden validointia.⁵ Tämä vaihe voidaan jakaa kahteen osaan: 1. tilojen suunnitteluun sekä välineiden ja tarvikkeiden kvalifointiin ja 2. prosessin suorituskyvyn kvalifointiin. Prosessin kvalifointi toteutetaan prosessin suunnitteluvaiheessa suoritettujen karakterisoinnin tulosten perusteella.

Prosessin suorituskyvyn kvalifiointi (*process performance qualification, PPQ*), yhdistää henkilökunnan sekä prosessin kvalifioinnin ensimmäisessä vaiheessa kvalifioituneet tilat, käyttöhyödykkeet ja välineet, tuotantoprosessiin ja suoritettaviin toimenpiteisiin. Tämän vaiheen tavoitteena on osoittaa, että prosessi toimii odotusten mukaisesti ja tuottaa normaaliolosuhteissa vaatimukset täyttäviä tuotteita.⁵

Kaikki suoritettavat toimenpiteet suunnitellaan ennalta ja raportoidaan yrityksen ohjeistusten mukaisesti. PerkinElmer Wallac Oy:llä on menetelmäohjeet muun muassa validointisuunnitelman sekä validointiraportin laatimiseen ja ne katselmoidaan ja hyväksytään validoinnin ohjausryhmässä (VST). VST koostuu tuotannon, laadun, tuotekehityksen ja validoinnin edustajista, ja kokoonpano vaihtelee hieman käsiteltävän asian mukaan.⁴

Jatkuva valvonta (*Continued Process Verification*)

Tämän vaiheen tarkoituksena on säännöllisen valvonnan avulla varmistaa ja osoittaa, että prosessi pysyy kontrolloidussa tilassa.⁵ Prosessin normaalia toimintaa seurataan ja tulosten perusteella arvioidaan prosessin tilaa. Seurannan tiheys, näytteenottotapa, datan keräys ja arviointi sekä tulosten käsittely suunnitellaan kullekin prosessille sopiviksi. Jatkuvaa valvontaa kutsutaan myös prosessinaikaiseksi valvonnaksi (*in process control*). Jatkuvan seurannan avulla voidaan havaita prosessissa mahdollisesti tapahtuvat muutokset. Muutoksen ja riskien arvioinnin perusteella päätetään, suoritetaanko verifiointi vai uudelleenvalidointi (Kuvio 2).



Kuvio 2. Uudelleenvalidointitarve.

2.3 Kemikaaliturvallisuus ja boraattipuskuri

Euroopan kemikaalivirasto (ECHA, *European Chemicals Agency*) auttaa yrityksiä noudattamaan EU:n kemikaalilainsäädäntöä. Tällä tavalla edistetään kemikaalitietoutta ja parannetaan työturvallisuutta. ECHA pyrkii suojelemaan ihmisten terveyttä sekä ympäristöä.⁶ Euroopan unionin kemikaalilainsäädännön neljä asetusta takaavat kemikaalien vapaan liikkumisen Euroopan unionin alueella sekä kemikaalien turvallisuuden. ECHA varmistaa, että näitä säädöksiä noudatetaan Euroopan unionin alueella sekä Euroopan talousalueella (ETA) eli Islannissa, Norjassa ja Liechtensteinissa.⁷

Yksi EU:n kemikaalilainsäädännön neljästä asetuksesta on REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), joka koskee kemikaalien rekisteröintiä, arviointia, lupamenettelyjä ja rajoituksia. REACH-asetusta sovelletaan kaikkiin kemiallisiin aineisiin, joita valmistetaan tai markkinoidaan Euroopan unionin alueella. Asetus luo yrityksille velvollisuuden tunnistaa ja hallita riskejä. Yrityksen tulee voida osoittaa, että kemikaalien käyttö on turvallista, ja että kemikaalien käyttäjät ovat tietoisia riskeistä ja riskinhallintatoimenpiteistä. REACH-asetus tuli voimaan 1. heinäkuuta 2007.⁸

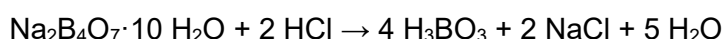
REACH-asetukseen kuuluva lupamenettely toimii siten, että yritys rekisteröi aineensa ja kemikaalivirasto arvioi rekisteröinnin vaatimustenmukaisuuden. EU:n jäsenvaltiot taas

selvittävät onko aineen kohdalla syytä huoleen ihmisen terveyden tai ympäristön kannalta.⁸ Mikäli huolenaihetta löytyy, voidaan ainetta ehdottaa lisättäväksi erityistä huolta aiheuttavien aineiden listalle (SVHC, *substances of very high concern*). Aikomus tulee julkistaa ennen ehdotuksen jättämistä, jotta teollisuus ja muut sidosryhmät saavat ennakkotiedon asiasta. Ehdotuksen julkaisemisen jälkeen kuka tahansa voi kommentoida ja jättää lisätietoja asiaa koskien. Jäsenvaltioiden komitea käsittelee huomautukset ja päättää, lisätäänkö aine huolta aiheuttavien aineiden listalle ja sitä kautta mahdollisesti myös ehdokasluetteloon.⁹

Lupamenettelyn avulla varmistetaan, että SVHC-aineiden riskit ovat hallinnassa ja että aineista pyritään pikkuhiljaa pääsemään kokonaan eroon. Ehdokasluettelosta (REACH-asetuksen 59 artikla) aineita voidaan siirtää luvanvaraisten aineiden listalle, jolloin niitä ei voida käyttää tai saattaa markkinoille määrätyn päivämäärän jälkeen (sunset date). Aineen valmistaja, maahantuoja tai jatkokäyttäjä voi kuitenkin hakea aineelle käyttö lupaa tai vapautusta lupamenettelystä.¹⁰ Lupa voidaan myöntää, mikäli aineen käytöstä aiheutuvat riskit ovat hallinnassa tai jos aineen käytön sosioekonomiset hyödyt ylittävät sen käytöstä aiheutuvat haitat¹¹. Lupahakemuksen liitteeksi tulee kuitenkin toimittaa korvaussuunnitelma ja käyttöluvan hakeminen on erittäin kallista².

Kun dinatriumtetraboraattia liuottaa, se hajoaa vesiliuoksessa boorihapoksi ja sen natriumsuolaksi (Kaava 1). Boorihaposta ja dinatriumtetraboraatin dekahydraatista käytetäänkin yhteisnimitystä boraatit. Boraattipuskurista puhutaan, kun pH on säädetty halutulle tasolle.

Kaava 1. Dinatriumtetraboraatin dekahydraatin hajoaminen vesiliuoksessa



Boorihappo (CAS 10043-35-3) ja boorihapon natriumsuola eli dinatriumtetraboraatin dekahydraatti (CAS 1303-96-4) on lisätty ehdokasluetteloon kesäkuussa 2010. Kummankin aineen tapauksessa syynä on vaarallisuus lisääntymiselle (REACH-asetuksen artikla 57(c): lisääntymiselle vaarallisten aineiden kategoria 1A tai 1B). Aineet on luokiteltu kategoriaan 1B, ja niiden vaaralauseke on H360FD: Saattaa heikentää hedelmällisyyttä ja vaurioittaa sikiötä.^{12,13} Mikäli aineet hyväksytään luvanvaraisten aineiden listalle, sen käyttö tulee lopettaa ETA-alueella määrättyyn ajankohtaan mennessä. Päätös tulee todennäköisesti vuoden 2016 aikana. PerkinElmer Wallac Oy:ssä boraatteja käytetään

raaka-aineena vasta-aineiden leimauksessa käytettävään 0,1 M boraattipuskurin valmistuksessa. Boraattipuskurista luopuminen on perusteltua sen haitallisten ominaisuuksien vuoksi, vaikka aineet eivät päätyisikään luvanvaraisten aineiden listalle.

Boraattipuskuri täytyy siis korvata jollain tarkoitukseen sopivalla puskurilla. Muutos prosessissa synnyttää tarpeen uudelleenvaihto- ja uudelleen rekisteröintitarpeen arvioinnille. Prosessi aloitetaan prosessivalidoinnin ensimmäisestä vaiheesta eli prosessin suunnittelusta (*process design*), johon kuuluu riskiarvioinnin laatiminen ja korvaavien puskurivaihtoehtojen kartoittaminen sekä karakterisointitestit. Tämän opinnäytetyön tavoitteena on suorittaa edellä mainitut prosessivalidoinnin vaiheet. Opinnäytetyön eli karakterisoinnin tulosten perusteella määritetään tarvittavat jatkotoimenpiteet, esimerkiksi validointitarve.

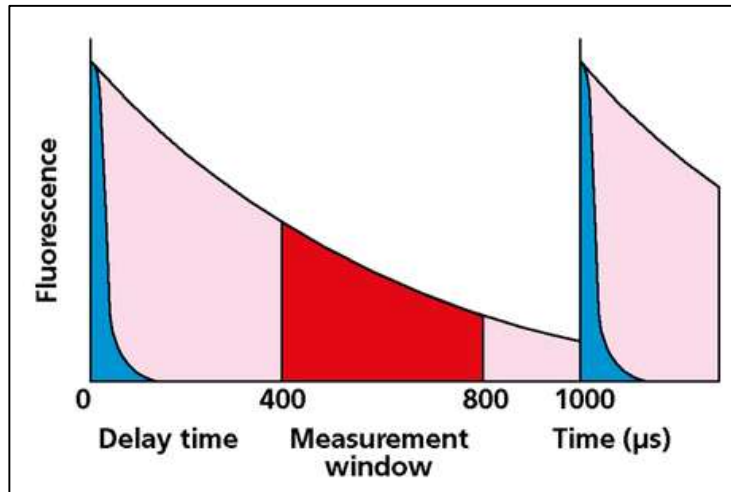
3 DELFIA®-TEKNOLOGIA

DELFIA® (*Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescence Immunoassays*) on PerkinElmer Wallac Oy:n immunomääritysmenetelmä, joka perustuu lantanidikelaatteihin ja aikaerotteiseen fluorometriaan.¹⁴ DELFIA-kiteillä määritetään eri analyyttien määriä potilasnäytteissä, ja saatuja tuloksia käytetään diagnoosin tekemiseen sekä hoidon suunnitteluun ja seurantaan. Tuoteryhmiä ovat muun muassa vastasyntyneiden seulontaan ja raskauden seurantaan käytettävät tuotteet.

3.1 Aikaerotteinen fluorometria

Kun tietyn aallonpituuden omaava valokvantti törmää atomin elektronipilveen, osa elektroneista siirtyy perusenergiatasosta korkeammalle energiatasolle eli elektronit virittyvät. Fluoresoivien yhdisteiden elektronit pystyvät kuitenkin palaamaan perusenergiatasolle säteilemällä energiaa takaisin. Tätä säteilyä kutsutaan emissiovaloksi ja sillä matalampi energiataso, kuin viritysvälillä, koska osa energiasta muuttuu lämmöksi. Matalamman energiatason myötä emissiovalon aallonpituus on suurempi kuin viritysvälillä. Viritysvälillä ja emissiovalon energioiden ja sitä kautta myös aallonpituuksien välistä eroa kutsutaan Stokesin siirtymäksi. Mitä suurempi Stokesin siirtymä on, sitä helpommin taustavalo saadaan suodatettua pois ja fluoresenssimittaus on herkempi.²¹

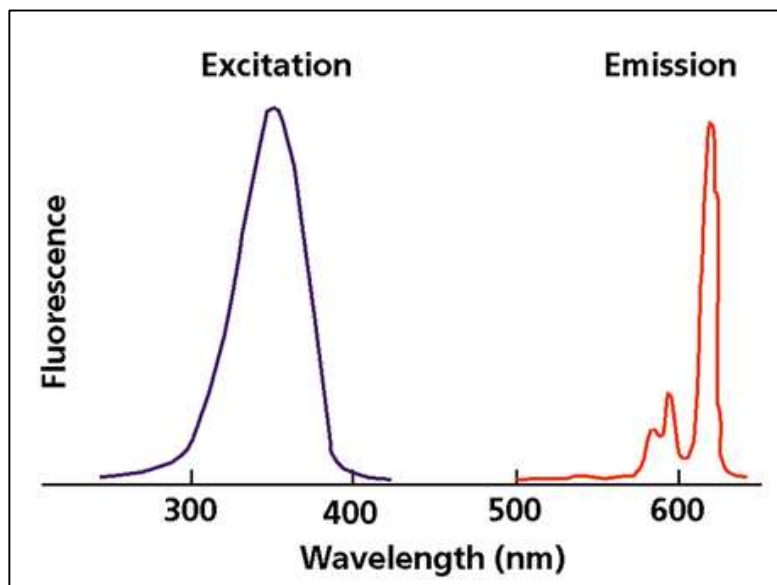
DELFIA-määrityksissä merkkiaine viritetään lyhyellä virityspulssilla (340 nm), minkä jälkeen odotetaan 400 µs ennen mittauksen aloittamista, jolloin taustafluoresenssi ehtii laantua. Fluoresenssi mitataan aikavälillä 400–800 µs (615 nm), ja uusi virityspulssi annetaan millisekunnin kohdalla. Mittauksia toistetaan 1000 kertaa sekunnissa ja tulos on näiden mittausten summa (Kuvio 3).¹⁵



Kuvio 3. Aikaerotteinen fluorometria.¹⁵

3.2 Lantanidikelaatit

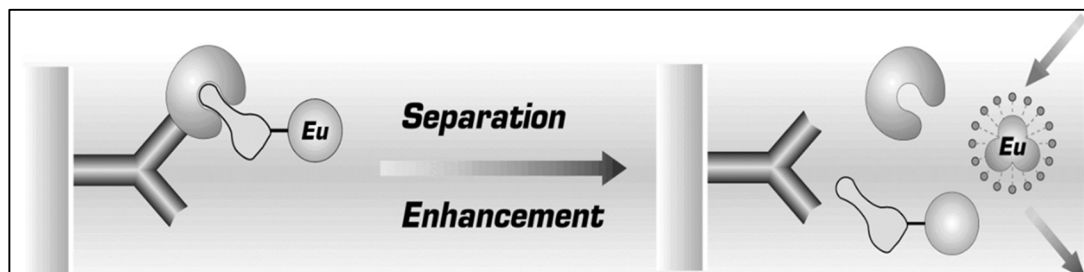
DELFI-määrityksessä käytetään merkkiaineina lantanidikelaatteja, jotka eivät itsessään ole fluoresoivia. Lantanidit fluoresoivat vasta, kun niihin liitettyä ligandia viritetään. Käytetyistä lantanideista yleisin on europium, mutta myös samariumia, terbiumia ja dysprosiumia hyödynnetään. Lantanidikelaateilla on suuri Stokesin siirtymä, esimerkiksi europiumilla noin 290 nm, eikä viritys- ja emissiopeikeillä ole lainkaan päällekkäisyyttä (Kuvio 4).¹⁵



Kuvio 4. Europiumin viritys- ja emissiovalo.¹⁵

Pääemissiopiikit ovat myös selvästi erottuvia ja kapeita, mikä helpottaa mittaamista ja parantaa menetelmän herkkyyttä. Lisäksi lantanidikelaattien pitkä emissiovalon kesto mahdollistaa taustasäteilyn vaikutuksen minimoimisen: signaali voidaan mitata vasta hetken kuluttua virityksestä, jolloin kaikki lyhytkestoinen emissiovalo on jo ehtinyt sammua.¹⁶ Uniikkien fluoresenssi-ominaisuuksiensa lisäksi lantanidikelaattien etuihin kuuluu myös esimerkiksi niiden pieni koko, suuri vesiliukoisuus ja matala toksisuus¹⁷.

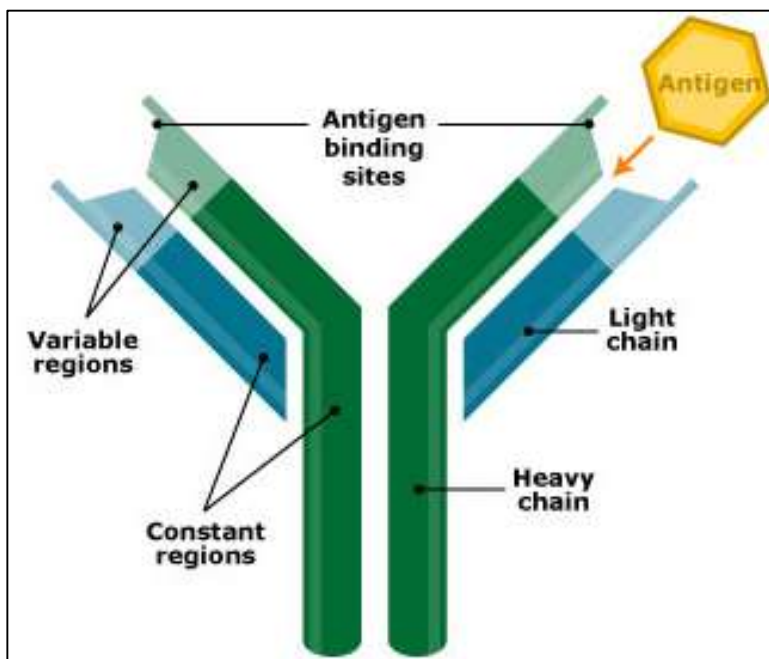
Lantanidit on konjugoitu kelaatteihin, joiden tarkoitus on ainoastaan kuljettaa lantanidionit määrittelyn läpi. DELFIA-määrittelyssä kelaatteina käytetään pääsääntöisesti isotiosyanaattiaktivoituja kelaatteja. Muodostetut lantanidikelaatit ovat stabiileja ja hydrofobisia, mutta ne eivät omaa energian sitomis- tai siirtokykyä, eli ne eivät myöskään fluoresoi. (Henkilökohtainen tiedonanto, Pertti Hurskainen 20.1.2016) Vasta määrittelyn viimeisessä vaiheessa lantanidit muutetaan mitattavaan muotoon lisäämällä näytteisiin mittaliuosta, jonka alhainen pH muuttaa ei-fluoresoivan lantanidikelaatin pysymättömäksi. Vapaat lantanidi-ionit sitoutuvat mittaliuoksessa olevaan uuteen, UV-valoa absorboivaan ligandiin, muodostaen voimakkaasti fluoresoivia lantanidikelaatteja. Mittaliuoksessa on myös muita molekyylejä, joiden tehtävä on suojata muodostuneita lantanidikelaatteja vedeltä (Kuvio 5).¹⁷



Kuvio 5. Fluoresoivan lantanidikelaatin muodostuminen.

3.3 Immunomääritykset

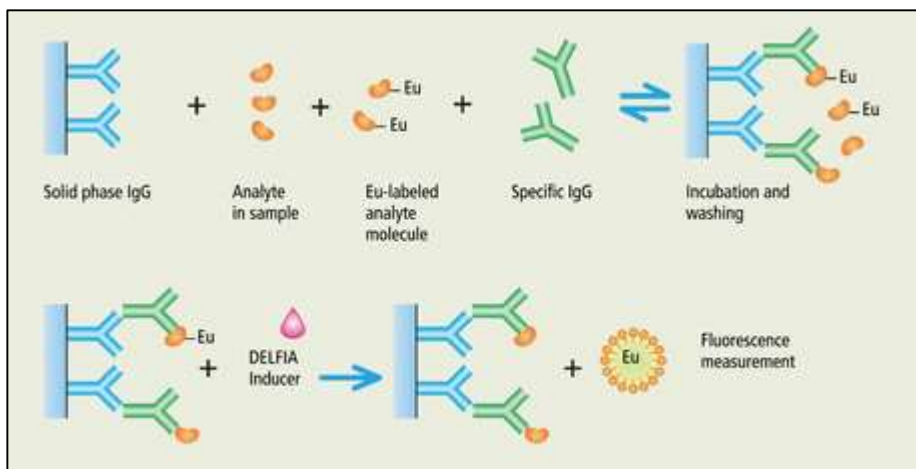
Vasta-aineet sitovat antigeenejä spesifisesti niiden antigeenin sitoutumiskohdan kautta (Kuvio 6). Sitoutumiskohdat ovat komplementaarisia antigeenien epitoopeille. Sitoutuminen tapahtuu ei-kovalenttisten sidosten avulla, mutta siitä huolimatta vasta-aineet ja antigeenit muodostavat stabiileja komplekseja.¹⁸



Kuvio 6. Antigeenin sitoutuminen vasta-aineeseen (IgG).¹⁹

Immunomääritykset hyödyntävät tätä vasta-aineen ja antigeenin reaktiota molekyylien tunnistamiseen. Reaktiota seurataan merkkiaineiden eli leimojen avulla: DELFIA-määrityksissä leimana käytetään lantanidikelaatteja. Määrityksiä on olemassa kahta päätyyppiä: kilpaileva määrittäminen eli FIA ja ei-kilpaileva määrittäminen eli IFMA. Määritykset ovat yleisimmin IFMA-tyyppisiä, mutta FIA-määrittästä käytetään silloin, kun mitattava analyysi ei pienen kokonsa takia pysty sitomaan useampaa vasta-ainetta.²⁰

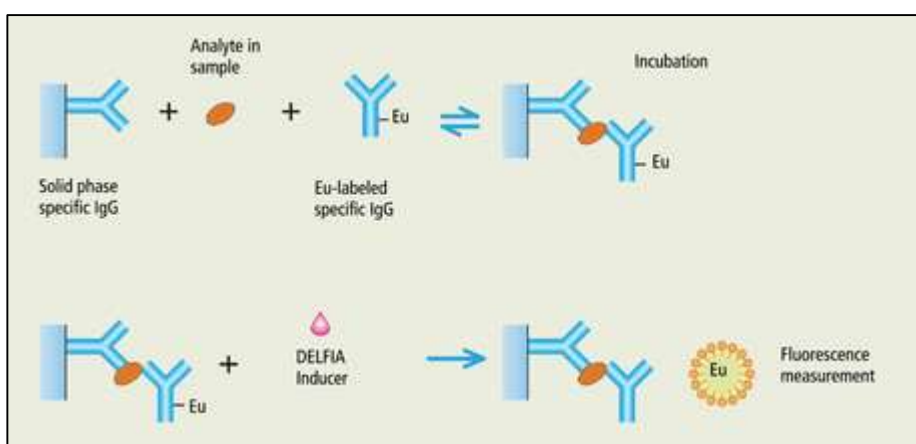
Kilpaileva määrittys (FIA)



Kuvio 7. Kilpaileva määrittys, FIA.¹⁵

Kilpailevassa määityksessä (FIA) kuoppalevyn pinta on pinnoitettu spesifisellä vasta-aineella (IgG). Kuoppiin annostellaan samanaikaisesti näyte, leimattua antigeeniä ja rajallinen määrä vasta-ainetta, joka sitoutuu spesifisesti kuopan pinnassa olevaan vasta-aineeseen. Näytteen antigeenit ja leimatut antigeenit kilpailevat sitoutumispaikoista tähän vasta-aineeseen, sillä niillä on sama sitoutumispaikka ja paikkoja on rajallinen määrä (Kuvio 7). Tällöin fluoresenssi on sitä pienempi, mitä enemmän näyte sisältää tutkittavaa antigeeniä.²¹

Ei-kilpaileva määrittys (IFMA)



Kuvio 8. Ei-kilpaileva määrittys, IFMA.¹⁵

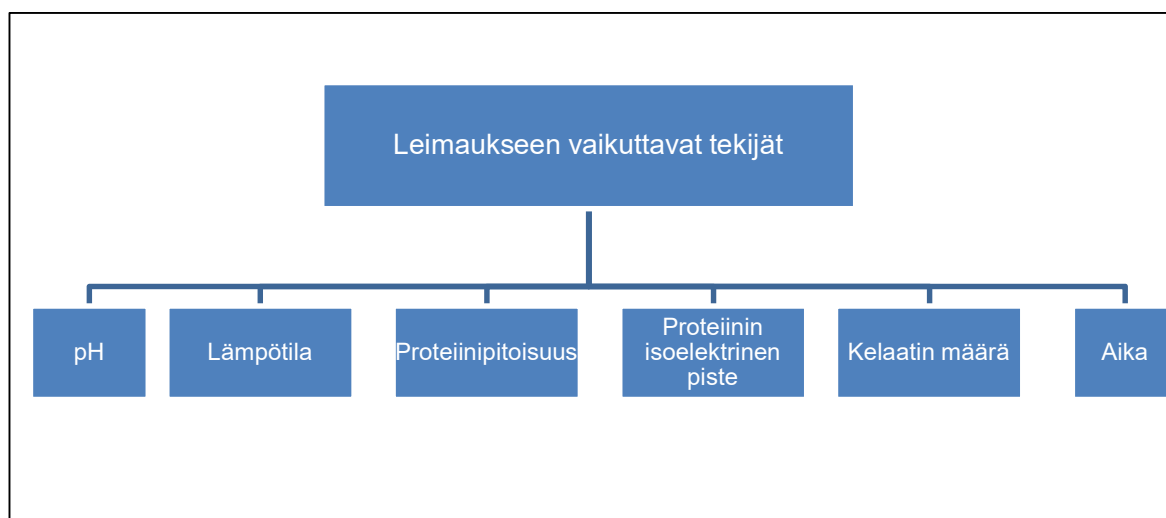
Myös ei-kilpailevassa määrityksessä (IFMA) kuoppalevyn pinta on pinnoitettu spesifillä vasta-aineella. Reagensseja ei kuitenkaan annostella kuoppaan samanaikaisesti, kuten kilpailevassa määrityksessä. Ensin kuoppaan pipetoidaan näyte, joka sisältää tuntemattoman määrän tutkittavaa antigeeniä. Näytteen sisältämät antigeenit sitoutuvat spesifisesti kuopan pintaan kiinnitettyihin vasta-aineisiin. Vasta-ainetta on kuopan pinnassa ylimäärin eli kaikki näytteessä olevat antigeenit pystyvät sitoutumaan. Tämän jälkeen suoritetaan pesu, ja kuoppiin annostellaan leimattua vasta-ainetta. Tämä vasta-aine sitoutuu näytteen antigeeniin, tosin eri kohtaan, kuin kuopan pinnassa oleva vasta-aine (Kuvio 8). Näin ollen leimattua vasta-ainetta sitoutuu sitä enemmän, mitä enemmän näytteessä on tutkittavaa antigeeniä, ja mittauksessa fluoresenssi on suoraan verrannollinen antigeenin määrään.²¹

4 VASTA-AINEIDEN LEIMAUS

Leimavalmistuksessa valmistetaan europiumilla (Eu) tai samariumilla (Sm) leimattuja vasta-aineita ja antigeenejä. IFMA-tyyppisissä määrityksissä käytettävien vasta-aineiden leimausprosessin vaiheita ovat vasta-aineen konjugointi, geelifiltraatio, fraktioiden testaus ja laadunvalvonta (*in process control*). Valmistetut kantaliuokset laimennetaan, suodatetaan, pulloitetaan ja etiketöidään.²² Tässä osiossa esitellään ensin leimaukseen vaikuttavat tekijät, ja sen jälkeen kuvataan tarkemmin itse leimausprosessi.

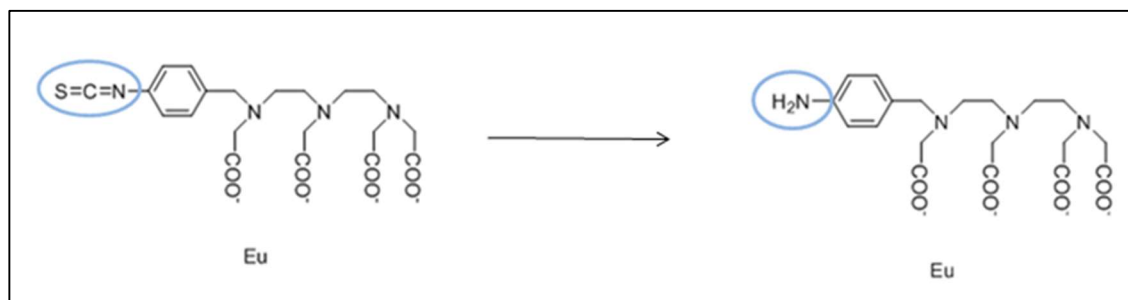
4.1 Leimaukseen vaikuttavat tekijät

Erilaisilla prosessiparametreilla (Kuvio 9) on suuri vaikutus siihen, kuinka tehokkaasti halutut vasta-aineet leimautuvat. Näiden kriittisten tekijöiden tuntemus onkin avainasemassa leimausprosessin tehokkuuden optimoinnissa. Alla on esitelty olennaisempien tekijöiden vaikutus vasta-aineiden leimauksessa (Kuvio 9).



Kuvio 9. Leimaukseen vaikuttavat tekijät.

Vasta-aineiden leimaukseen käytettävien leimakelaattien reaktiivinen ryhmä on isotiosyanaatti-ryhmä (ITC). Kelaattien pysyvyyttä rajoittaa se, että kosteus ja vesi aiheuttavat ITC-ryhmän hajoamista säilytyksen aikana (Kuvio 10). Hajoaminen on sitä nopeampaa, mitä korkeampi pH on.



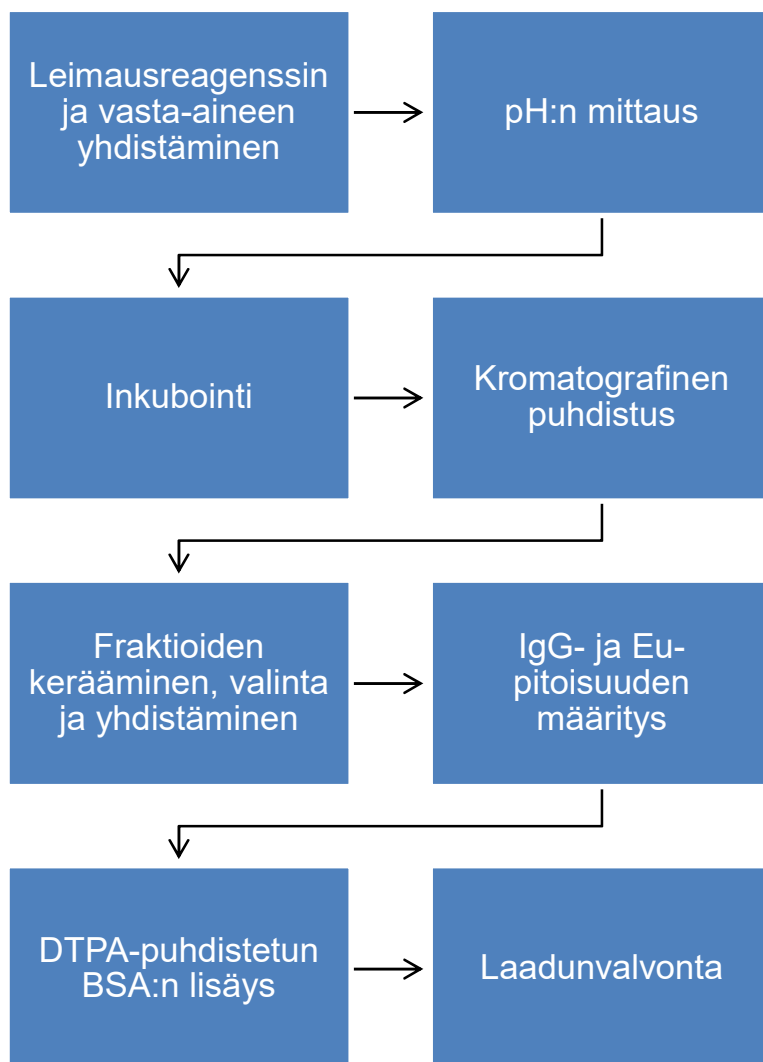
Kuvio 10. Kelaatin ITC-ryhmän hajoaminen aminoryhmäksi.

ITC-ryhmä reagoi proteiinissa aminoryhmien (NH_2), hydroksyyliiryhmien (OH) ja tioliryhmien (SH) kanssa. Tioliryhmän kanssa sidoksesta ei kuitenkaan muodostu pysyvä. Leimavalmistuksessa vasta-aineita leimataan nimenomaan aminoryhmien *Lys*-tähteiden kautta. Neutraalissa pH:ssa *Lys*-tähteet ovat suurimmaksi osaksi proteiinien pinnalla, jolloin ne ovat leimattavissa. Mitä korkeampi pH on, sitä enemmän *Lys*-tähteiden aminoryhmät ovat deprotoituneita, ja sitä tehokkaampaa leimaus on. Toisaalta, kuten edellä mainittiin, korkeassa pH:ssa ITC-ryhmän hajoaminen on nopeampaa. Lämpötila vaikuttaa samalla tavalla: korkeassa lämpötilassa kelaatti reagoi tehokkaammin aminoryhmien, mutta myös veden kanssa. On huomioitava, että leimattavan vasta-aineen stabilointiin ei voida käyttää proteiineja, sillä tällöin myös stabiloivat proteiinit leimautuisivat aiheuttaen määrityksiin taustaa. Samasta syystä kaikki muutkin ITC-kelaatin kanssa reagoivat yhdisteet, kuten Tris-puskuri, on poistettava ennen leimausta.

Proteiinipitoisuus ja proteiinin isoelektrinen piste (pI) vaikuttavat leimaustehokkuuteen. Proteiinipitoisuus on suoraan verrannollinen *Lys*-tähdepitoisuuteen, joten mitä suurempi proteiinipitoisuus on, sitä enemmän on myös *Lys*-tähteitä ja sitä tehokkaampaa leimaus on. Leimaus-pH ja sen suhde isoelektriseen pisteeseen on myös olennainen asia, kun tarkkaillaan leimauksen tehokkuutta. Tämä johtuu siitä, että Eu-N^1 -kelaattien nettovaraus on -1 ja Eu-N^3 -kelaattien -2. Näin ollen kelaattien ja negatiivisesti varautuneiden proteiinien välillä tapahtuu hylkimistä. Proteiinin isoelektrisessä pisteessä sen nettovaraus on nolla, joten mikäli proteiinin pI on suurempi tai yhtä suuri kuin leimaus-pH, ei hylkimistä proteiinin ja kelaatin välillä tapahdu. (Henkilökohtainen tiedonanto, Pertti Hurskainen 17.12.2015)

4.2 Leimausprosessi

Tässä kappaleessa on esitelty yleisesti IFMA-tyyppisissä määrityksissä käytettävien vasta-aineiden leimausprosessi, johon kuuluu vasta-aineiden konjugointi, kromatografinen puhdistus, fraktioiden mittausta ja yhdistäminen sekä laadunvalvonta (Kuvio 11).



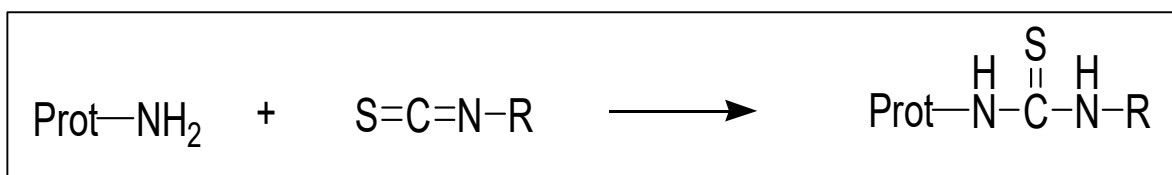
Kuvio 11. Vasta-aineiden leimausprosessi.²³

Eri vasta-aineiden leimausprosessit eroavat toisistaan esimerkiksi reagenssimäärien ja prosessiparametrien osalta, mutta pääpiirteissään ne noudattavat kaikki samaa kaavaa. Wallac Oy:llä on kullekin kantaliuokselle valmistusohje, jonka mukaan toimitaan. Näistä ohjeista löytyvät myös raja-arvot kaikille suoritettaville mittauksille ja hyväksymisrajat laadunvalvonnalle.

Vasta-aineiden konjugointi

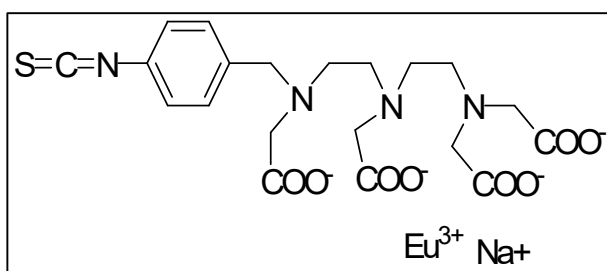
Leimausprosessi alkaa tarvittavien liuosten valmistamisella, vasta-aineliuoksen sulattamisella ja leimausreagenssin eli kelaatin liuottamisella. Leimausreagenssin ja vasta-aineliuoksen yhdistämisen jälkeen tarkastetaan pH ja siirretään seos inkuboitumaan tiettyyn lämpötilaan. Tarvittaessa pH säädetään oikeaksi ennen inkuboinnin aloittamista.

Inkuboinnin aikana vasta-aine ja leimakelaatti reagoivat keskenään ja muodostuu erittäin pysyvä tioureasidos, $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ (Kaava 2).

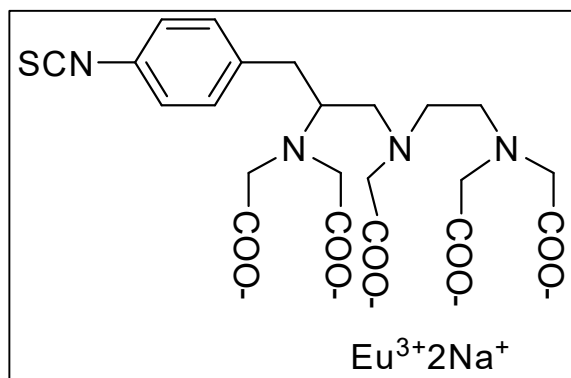


Kaava 2. Proteiinin leimaus aminoryhmän kautta ITC-kelaatilla.

Leimakelaatteina käytetään Eu-N^1 - ja Eu-N^3 -ITC-kelaatteja sekä Sm-N^1 -ITC-kelaatteja. N^1 - ja N^3 -kelaattien rakenteet eroavat toisistaan hieman (Kuvio 12, Kuvio 13), mutta leimausreaktio on kummankin kohdalla samanlainen, sillä reaktiivinen ryhmä on sama (Kaava 2.) (Henkilökohtainen tiedonanto, Pertti Hurskainen 17.12.2015).



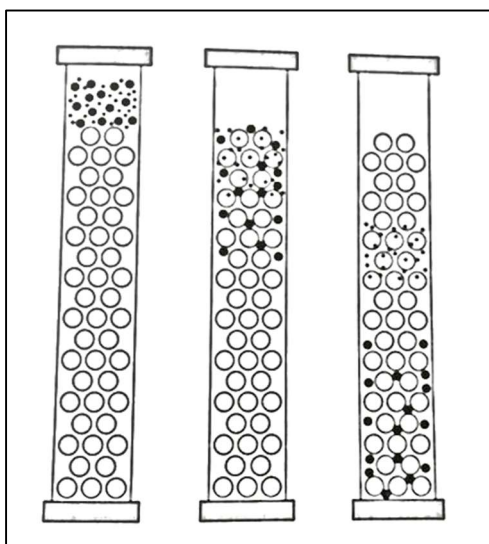
Kuvio 12. Eu-N^1 -ITC-kelaatti.



Kuvio 13. $\text{Eu-N}^3\text{-ITC}$ -kelaatti.

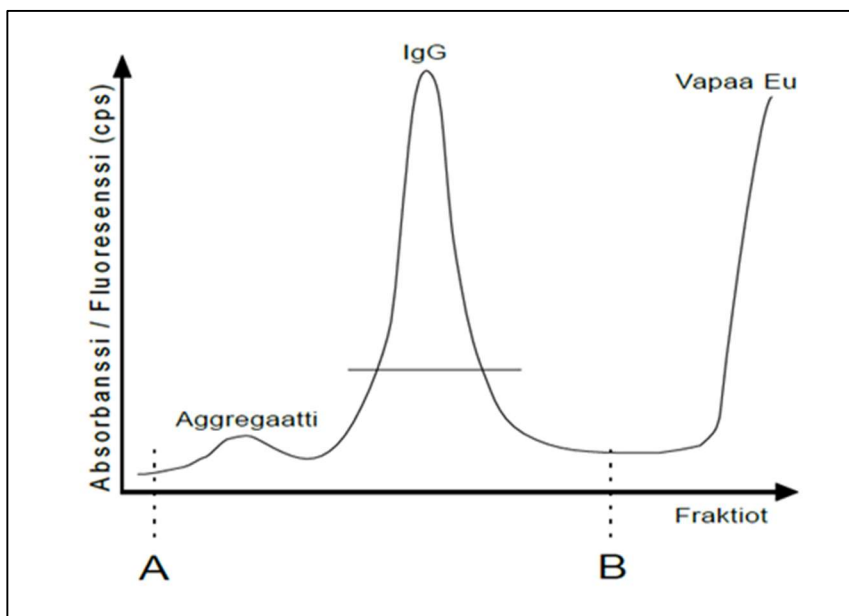
Puhdistus geelikromatografilla

Tietyn inkubointiajan jälkeen leima-vasta-aineseos puhdistetaan geelikromatografilaitteistolla (Kuvio 14). Leima-vasta-aineseos applikoidaan välittömästi inkuboinnin jälkeen kolonniin, jossa on tietyn huokoskoon omaavaa geeliä. Geelikromatografi erottelee molekyylit niiden koon perusteella ²⁴. Geelimatriksin valintaan vaikuttaa se, minkä kokoisia molekyylejä ollaan erottamassa. Seoksen molekyylit eluoituvat kolonnista kokonsa perusteella: suurimmat tulevat ulos ensin ja pienemmät myöhemmin. ²⁵ Tämä johtuu siitä, että keskikokoiset molekyylit mahtuvat matriksin suurempiin huokosiin ja pienet myös kaikkein pienimpiin huokosiin. Suurimmat molekyylit taas eivät mahdu huokosiin ollenkaan, joten ne kulkevat nopeammin kolonnin läpi ²⁴.



Kuvio 14. Geelikromatografian periaate. ²⁴

Kuten alla olevasta kuvasta näkyy (Kuvio 15), ensimmäisenä tulevat ulos mahdolliset IgG-aggregaatit, sitten monomeeri-IgG ja viimeisenä vapaa leima.²⁶



Kuvio 15. Puhdistuksen absorbanssi-/fluoresenssikäyrä.²⁶

Fraktionkerääjä kerää eluaatin samalla, kun UV-detektori mittaa sen absorbanssin. Laitteistoon liitetty piirturi piirtää signaalin perusteella kuvaajan, josta nähdään kunkin fraktion absorbanssi. Tämän kuvaajan perusteella nähdään, mitkä fraktiot sisältävät tuotetta, eli leimattua vasta-ainetta. Geelifiltration avulla saadaan siis erotettua reagoimaton ke-laatti ja mahdolliset aggregoituneet vasta-aineet itse tuotteesta. Samalla vaihdetaan vasta-aineseoksen puskuri leimauspuskurista 50 mM TSA-puskuriin.

Fraktioiden mittaus ja yhdistäminen

Absorbanssikäyrän perusteella valituista fraktioista (Kuvio 15, fraktiot väliltä A-B) mitataan fluoresenssit ja piirretään fluoresenssikäyrä. Näin saadaan selville fraktioiden europium- tai samariumpitoisuudet. Fraktioista valitaan yhdistettäväksi ne, joiden pitoisuus on riittävän suuri. Valinta tehdään tarkastelemalla sekä absorbanssi- että fluoresenssikäyrää. Yhdistettävien fraktioiden fluoresenssin sekä kokonaisfluoresenssin perusteella lasketaan, kuinka suuri osa vasta-aineesta saatiin talteen (saalis-%) eli kuinka suuri osa vasta-aineesta on saatu leimattua. Tämän avulla leimatun vasta-aineen massasta saadaan laskettua leimaussaalis (saalis mg). Leimaussaalis on normaalisti noin 90 %, mutta vaihtelee eri kantaliuoksilla. Yhdistetyistä fraktioista mitataan tilavuus ja määritetään eu-

ropium- ja vasta-aine pitoisuus. Näistä lasketaan leimausaste, joka on europiumpitoisuuden ja vasta-ainepitoisuuden suhdeluku (Eu/IgG). Tämä arvo kertoo sen, kuinka monta europiumia on kiinnittynyt kuhunkin vasta-aineeseen. Leimausasteen tavoitearvo riippuu leimattavasta vasta-aineesta ja määrittelyn herkkyydestä. Lopuksi leimakantaan lisätään säilyvyyden parantamiseksi 7,5 % DTPA-puhdistettua BSA:ta, sekä lasketaan kannan lopullinen tilavuus ja pitoisuus.

Laadunvalvonta

Laadunvalvonta suoritetaan tekemällä AutoDELFI-määritys valmistetulla vasta-aineella ja referenssimateriaalilla, ja vertaamalla saatuja tuloksia asetettuihin raja-arvoihin. Referenssimateriaalina käytetään aiemmin hyväksyttyä leimaa. Leimavalmistusprosessia ja sen tasaisuutta seurataan jatkuvasti kuvaajien avulla, joista löytyvät kaikkien leimaerien tulokset fraktiomittauksista ja laadunvalvonnasta.

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Karakterisointi aloitettiin riskiarvioinnin laatimisella ja korvaavan puskurin valinnalla. Tämän jälkeen valmistettiin kolme testierää, joille tehtiin kombinaatiotestit. Yhdelle testatuista leimoista tehtiin lisäksi kiihdytetty säilyvyystestaus. Valitun leimapuskurin ja kelaatin välistä reaktiivisuutta tutkittiin nestekromatografi-massaspektrometri-laitteistolla. Tässä kappaleessa on esitelty tarkemmin nämä karakterisoinnin vaiheet. Luottamuksellinen materiaali löytyy opinnäytetyön liitetiedostoista.

5.1 Puskurin valinta

Boraattipuskuria käytetään seitsemän eri kantaliuoksen valmistuksessa pH:n säätöön vasta-aineiden leimausvaiheessa. Kunkin kantaliuoksen valmistusohjeessa on määritetty inkuboinnille pH-alue, joka vaihtelee hieman eri kantaliuosten välillä. Puskurin valinnassa tulee ottaa huomioon, millä pH-alueella sen tulee puskuroida. Lisäksi puskurin rakenteen on oltava sopiva: esimerkiksi vapaita aminoryhmiä ei saa esiintyä, sillä ne reagoivat vahvasti leimauksessa käytettävän kelaatin kanssa. Boraattipuskurista haluttiin päästä eroon sen haitallisten ominaisuuksien vuoksi, joten korvaavan puskurin tuli olla työturvallisuuden kannalta sopiva. Puskurin valinnassa tarkasteltiin lisäksi mahdollisia toimittajia, hintaa sekä puhtausluokkaa.

Puskuri-vaihtoehtoja lähdettiin kartoittamaan ensin pH-alueen ja rakenteen perusteella, ja tällä tavalla valittiin neljä vaihtoehtoa (Liite 2). Käyttöturvallisuustiedotteita tarkastelemalla vaihtoehtoista karsittiin heti pois yksi, sillä se ärsyttää voimakkaasti silmiä. Kaikille vaihtoehtoilte tehtiin hintakartoitus Sigma-Aldrichilta ja ne ovat laadultaan Sigma-Aldrichin ELITE-luokkaa.

Boraattipuskurin korvaamisesta laadittiin riskiarviointiraportti (Liite 1), jossa selostettiin arvioinnin tarkoitus, projektin taustatiedot, arvioitiin riskit ja pohdittiin mahdollisia jatko-toimenpiteitä. Riskiarviointi katselmoitiin ja hyväksyttiin validoinninohjaus ryhmässä (VST) ennen karakterisointitestien aloittamista.

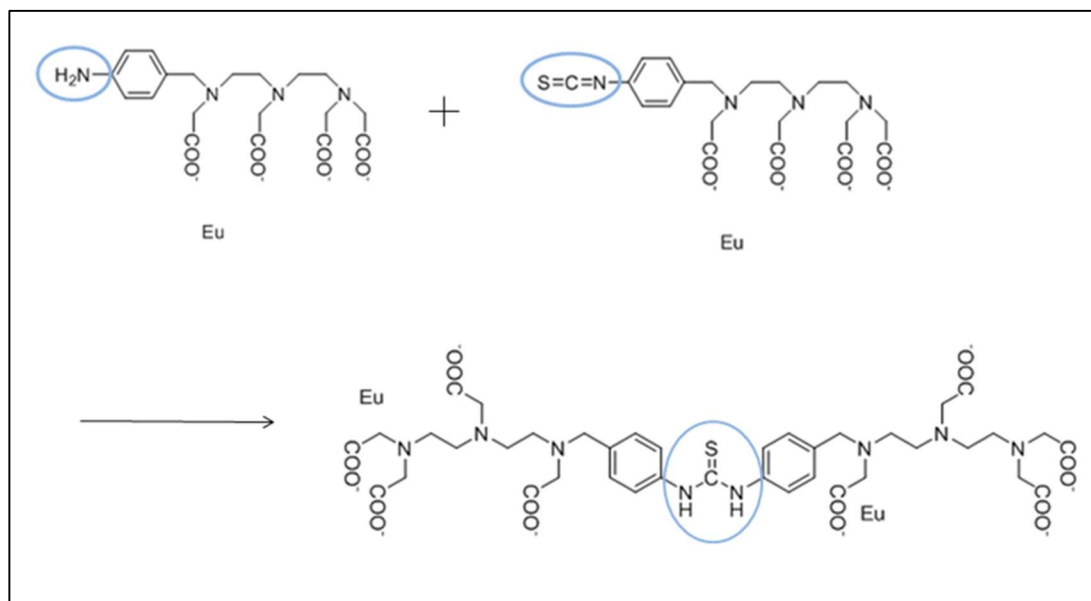
5.2 Karakterisointierät

Puskurin testaaminen aloitettiin seitsemästä boraattipuskurin avulla leimattavasta vasta-aineesta halvimmallalla. Kyseisestä vasta-aineesta valmistettavia kantaliuoksia valmistettiin kolme pientä testierää. Pienten mittakaavan leimausten on todettu vastaavan hyvin suurempia leimauksia. Näin ollen pienten testierien avulla saadaan tietoa myös suuremmista leimauksista.

Vasta-ainetta leimattiin kussakin testissä 5 mg, ja puskurin pitoisuus ja natriumkloridipitoisuus oli jokaisessa leimauksessa eri. Tarkemmat tiedot puskureista ja niiden valmistuksesta löytyvät liitteestä 3. Puskurin vaihtoa lukuun ottamatta kantaliuokset valmistettiin noudattaen tarkasti valmistusohjetta (valmistusohje: 13902694). Näin ollen leimauksen muut kriittiset prosessiparametrit: lämpötila, aika, pH, proteiinipitoisuus ja leiman pitoisuus pysyivät ennallaan. Kaikista kolmesta kantaliuoksesta tehtiin ohjeen (valmistusohje: 13903302) mukaan pullotuslaimennokset, ja pullotus sekä pullojen etiketöinti tehtiin käsin. Tarkempi kuvaus kantaliuosten valmistuksesta ja pullotuksesta löytyy liitteestä 4.

5.3 UPLC-MS-määritys

Eu-N¹-ITC-kelaatin aktiivinen isotiosyanaattiryhmä hajoaa vähitellen aminoryhmäksi, kun sitä inkuboidaan reaktiopuskurissa. Muodostunut aminoryhmä reagoi nopeasti Eu-N¹-ITC-kelaatin kanssa: isotiosyanaattiryhmän ja aminoryhmän välille muodostuu tioureasidos. Muodostunutta molekyyliä kutsutaan dimeeriksi (Kuvio 16).



Kuvio 16. Dimeerin muodostuminen.

Koska valitussa leimauspuskurissa on hydroksyyliiryhmiä, haluttiin tutkia niiden reaktiivisuutta Eu-N¹-ITC-kelaatin kanssa. Reaktio ei saa olla liian vahva (mieluiten ei reaktiota lainkaan), sillä kelaatin halutaan reagoivan puskurin sijaan leimattavan vasta-aineen kanssa. (Henkilökohtainen tiedonanto, Veli-Matti Mukkala 27.1.2016)

Määrittäksessä näytteen sisältämien molekyylien erotteluun käytettiin nestekromatografia (UPLC, *Ultra Performance Liquid Chromatography*) ja detektorina massaspektrometriä (MS, *Mass Spectrometer*) ja UV-detektoria. Nestekromatografi erottelee näytteen molekyylit polarisuuden mukaan ja massaspektrometri määrittää molekyylien massat. Nestekromatografissa on kaksi eri faasia: liikkuva faasi (neste) ja stationääri faasi (kiinteä). Näytteen molekyylit jakautuvat näiden kahden faasin välillä. Jakautuminen perustuu toistuviin sorptio- ja desorptiovaiheisiin näytteen liikkuesssa kolonnin läpi. Erottelu perustuu siihen, että erilaiset partikkelit jakautuvat hieman eri tavalla.²⁷ Massaspektrometrillä määritettiin nestekromatografilla erotellun näytteen molekyylien massat ja määrät. Massaspektrometria perustuu varattujen hiukkasten käyttäytymiseen sähkö- ja magneettikentässä: hiukkaset, joilla on sama massa ja varaus, kulkeutuvat detektorille samaan pisteeseen²⁸. Tuloksista piirtyy spektri, josta ilmenee molekyylien massa (x-akseli) ja määrä (y-akseli).

Määrittäksen avulla etsittiin tietynkokoisia molekyylejä: dimeeri, puskur, vapaa kelaatti ja puskur + kelaatti. Analyysin tarkoituksena oli tutkia, löytyykö näytteestä puskurin kanssa

sitoutunutta kelaattia. Kaikkien tutkittavien molekyylien molekyyli­massat tiedettiin, kun määritystä lähdettiin tekemään.

Analyysiä varten valmistettiin yksi erä, josta jätettiin leimattava vasta-aine kokonaan pois. Erä valmistettiin lähtökohtaisesti samalla tavalla, kuin testierä 1 (Liite 4). Erona oli vasta-aineen puuttuminen ja se, että inkuboinnin jälkeen prosessia ei jatkettu pidemmälle, vaan liuos pakastettiin. Ennen inkuboinnin aloittamista otettiin 700 µl näyte lähtötilanteen määrittämiseksi. Näytteitä oli kaiken kaikkiaan kolme: inkuboimaton näyte, inkuboitu näyte ja referenssinä veteen liuotettu Eu-N¹-ITC-kelaatti. Ennen analyysin aloittamista tarkistettiin spektrofotometrillä, ettei referenssinä käytetty Eu-N¹-ITC-kelaatti ollut hajonnut. UV-spektrin perusteella (Liite 9) saatiin helposti selville kelaatin laatu: kohdassa 240 nm olevan laakson korkeuden suhde kohdassa 269 nm olevan piikin korkeuteen on oltava tietyn rajan alapuolella. Jos Eu-N¹-ITC-kelaatin isotiosyanaattiryhmä on alkanut hajota, laakso kohoaa ylöspäin, jolloin suhdeluku kasvaa. Eu-N¹-ITC-kelaatti ei ollut lähtenyt hajoamaan, joten kyseistä kelaattia pysyttiin käyttämään määrittämisessä referenssimateriaalina. Tarkemmat tiedot määrittämisestä sekä käytetystä laitteistosta ja määrittämisparametreista löytyvät liitteestä 6.

5.4 Kombinaatio- ja säilyvyytestit

DEL­FIA-kittierä muodostetaan yhdistämällä hyväksytyt kittikomponentit kombinaatiksi. Kombinaatin komponenttien kemiallisen yhteensopivuuden varmistamiseksi tehdään kombinaatiotestit. Kombinaatiotestit ovat olennainen osa PerkinElmer Wallac Oy:n loppulaadunvalvontaa. Testeille on määritetty hyväksymisrajat sekä ohjausrajat, joilla tuotantoa seurataan ja ohjataan.²⁹ Kombinaatiotestien avulla haluttiin tässä tapauksessa varmistaa, että valmistetut leimaerät toimivat yhdessä muiden komponenttien kanssa. Säilyvyytestin tarkoituksena taas oli varmistaa, ettei puskurin vaihtaminen leiman valmistusvaiheessa ole vaikuttanut leiman säilyvyyteen.

Kombinaatiotestit

Kombinaatiotestit eli loppulaadunvalvontatestit tehtiin Wallacin loppulaadunvalvonnan laboratoriossa. Kukin leimaerä testattiin samalla tavalla: käytettävät laitteet ja pipetit sekä Eu-leimaa lukuun ottamatta kaikki testikomponentit olivat kussakin testissä samat. Testi tehtiin kahdella eri AutoDEL­FIA-automaatilla ja kummallakin laitteella testattiin neljä levyä. Tällä tavalla nähtiin myös laitteiden väliset erot. Kullekin testille rekisteröitiin

yhdelmä-numerot, joiden perusteella testit identifioitiin (Taulukko 1). Määrittämisestä saatu raaka-data löytyy liitteestä 10.

Taulukko 1. Yhdelmänumerot kombinaatiotesteissä.

Yhdelmänumero	Testattava leima
52692	Testileima 1
52693	Testileima 2
52694	Testileima 3

Määrittämisessä käytettävät kylmäkuivatut komponentit liuotettiin veteen ja kaikista reagensseista poistettiin kuplat. Standardit asetettiin automaattien standardi-telineeseen ja leimat sekä puskuriliuokset omille paikoilleen. Kalibraattorit pipetoitiin 3 ml muoviputkiin ja asetettiin oikeaan järjestykseen telineisiin (räkkeihin). Tämän jälkeen valittiin oikea testiohjelma, ladattiin kalibraattorit sekä levyt automaattiin ja käynnistettiin ajo. Tulokset luettiin seuraavana päivänä ja testimateriaalit säilytettiin kylmiössä, kunnes tuotannon asiantuntija oli tarkistanut ja hyväksynyt tulokset. Tuloksista tarkasteltiin kontrollien eroa tavoitteesta ja standardien korjausprosentteja. Saatuja tuloksia verrattiin aiempiin tuotannon yhdelmiin ja asetettuihin hyväksymisrajoihin.

Säilyvyystestit

Valmistettujen leima-liuosten säilyvyys testattiin kiihdytetyllä säilyvyystestauksella. Kiihdytetty säilyvyystestaus tarkoittaa tuotteen kelpoisuusaajan testaamista kiihdytetyissä olosuhteissa verrattuna tuotteelle määriteltyihin säilytysolosuhteisiin. Yleensä normaali säilytyslämpötila on + 4 °C (+ 2 - + 8 °C). Valmistaja takaa, että näissä säilytysolosuhteissa tuote täyttää sille asetetut laatuvaatimukset tuotteen viimeiseen käyttöpäivään asti. Komponenttien säilyvyystestaus suoritetaan loppulaadunvalvontatesti-menetelmää käyttäen, joka on toimivaksi todettu testimenetelmä.³⁰

Kiihdytetyissä säilyvyysseurannoissa tehdään tiettyjä olettamuksia: biomolekyylien hajoaminen noudattaa 1. asteen reaktiokinetiikkaa, puoliintumisaika ei ole riippuvainen konsentraatiosta ja hajoaminen noudattaa Arrheniuksen yhtälöä (Kaava 3. Arrheniuksen yhtälö.). Yhtälöä voidaan käyttää, sillä säilyvyys suosii kiinteää olomuotoa enemmän

kuin liuosta, vaikkakin tutkittava liuos on testauksessa kahdessa eri olomuodossa ja lämpötilaero on suuri. Aktivaatioenergian arvona käytetään yleisimmin arvoa 83 736 J/mol. Kyseistä arvoa voidaan käyttää, sillä testattavan tuotteen säilyvyys on tunnettu ja se on verifioitu reaaliaikatestein. Näiden lähtötietojen perusteella on laskettu vastaavuusaikoja, joiden perusteella voidaan arvioida tuotteiden säilyvyysaikoja. Vastaavuusaikojen perusteella arvioidaan myös säilytysaika kiihdytetyissä säilytysolosuhteissa, kun testataan tuotteen säilyvyyttä.³⁰

Kaava 3. Arrheniuksen yhtälö.³⁰

$$\ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) = \frac{E_a(T_2 - T_1)}{R \times T_1 \times T_2}, \text{ jossa}$$

k = nopeusvakio

E_a = aktivaatioenergia = 83 736 J/mol

R = kaasuvakio = 8,314 JK⁻¹ mol⁻¹

T = absoluuttinen lämpötila K (273,15 K + lämpötila °C)

Leiman normaali säilytyslämpötila on + 4 °C ja kiihdytetty säilytyslämpötila + 35 °C. Tällöin $T_1 = 273,15 \text{ K} + 4$ ja $T_2 = 273,15 \text{ K} + 35$. Yllä olevan yhtälön perusteella voidaan laskea tarvittava säilytysaika kiihdytetyssä lämpötilassa verrattuna normaaliin säilytyslämpötilaan. Kyseessä on siis se aika, jonka tuotteen pitää säilyä kiihdytetyissä olosuhteissa, jotta voidaan osoittaa, että tuote säilyy normaaliolosuhteissa viimeiseen käyttöpäivään asti.

Kaava 4. Päivien vastaavuuslukumäärä normaalissa säilytyslämpötilassa, kun säilytetty päivä kiihdytetyssä.³⁰

$$\ln\left(\frac{k_2}{k_1}\right) = \ln k_2 - \ln 1 = \ln k_2 = \frac{83736 \text{ Jmol}^{-1}(308 - 277)\text{K}}{8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1} \times 277 \text{ K} \times 308 \text{ K}}$$

$$k_2 = e^{3,6755} \approx 39$$

Tulos tarkoittaa sitä, että yksi päivä kiihdytetyissä olosuhteissa vastaa 39 päivää normaaliolosuhteissa. Tutkittavan leiman kestoiksi on määritetty 17 kuukautta eli sen tulee säilyä ainakin 18 kuukautta eli 540 päivää. Tällöin säilytysaika kiihdytetyissä olosuhteissa on: $540/39 = 13,8 \approx 14$ päivää.

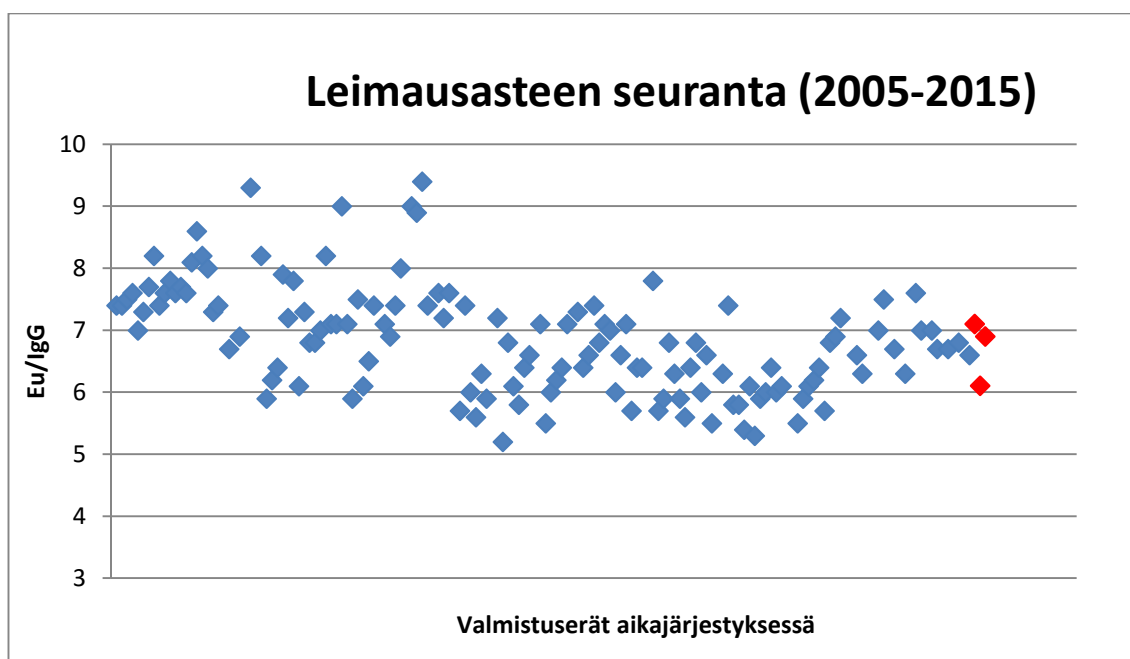
Tutkittavia leimapulloja säilytettiin siis 14 päivän ajan lämpökaapissa (+ 35 °C), minkä jälkeen ne siirrettiin takaisin kylmiöön (+ 4 °C). Pullot olivat kylmiössä yön yli, minkä jälkeen ne testattiin. Testissä käytettiin neljää levyä ja yhtä automaattia. Testi eroaa kombinaatiotesteistä testattavien levyjen ja automaattien lukumäärän perusteella, minkä takia myös hyväksymisrajat ovat hieman eri. Lähtöpisteen eli niin kutsutun nollapisteen määrittämiseksi testattiin samoilla testikomponenteilla myös leimapullot, jotka olivat koko ajan olleet normaaliolosuhteissa (+ 4 °C). Nollapisteen määrittäminen tehtiin loppulaadunvalvonnan kombinaatiotestinä kahdeksalla levyllä ja kahdella automaatilla (4 levyä/automaatti).

6 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Karakterisoinnissa saatuihin tuloksiin kuuluvat leimausprosessin aikana mitatut arvot, prosessinaikaisen laadunvalvonnan tulokset sekä UPLC-MS-määrittelyn sekä kombinaatio- ja säilyvyystestien tulokset.

6.1 Prosessinaikainen laadunvalvonta

Prosessinaikainen laadunvalvonta tehdään kaikille tuotannon leimaerille eli kyseessä on 100-prosenttinen laadunvalvonta. Alla olevassa kuviossa (Kuvio 17) näkyy, että karakterisoinneissa valmistettujen leimaerien leimausaste on samaa luokkaa, kuin aiempien tuotantoerien leimausasteet. Voidaan siis todeta, että leimauspuskurin vaihto ei ole vaikuttanut leimausasteeseen eli siihen, kuinka monta europiumkelaattia on sitoutunut yhteen vasta-aineeseen.



Kuvio 17. Leimausasteen seuranta.

Prosessinaikaiseen laadunvalvontaan kuuluu myös AutoDELFIA-määrittelyn tekeminen valmistetulle leimalle käyttäen referenssinä aiempaa, hyväksyttyä leimaerää. Tuloksia luettaessa tarkasteltiin standardien A ja F signaaleja (cps) ja määrittelyn herkkyyttä (U/mL). Raja-arvoina käytettiin samoja arvoja, kuin normaaleissa tuotantoerissä. Sekä

raja-arvot että numeeriset tulokset löytyvät liitteestä 5. Kuten alla olevasta taulukosta (Taulukko 2) näkyy, kaikki tulokset olivat hyväksymisrajoissa.

Taulukko 2. Laadunvalvonnan tulokset.

	Standardi A		Standardi F		Herkkyys	
Erä	testattava	referenssi	testattava	referenssi	testattava	referenssi
1	OK	OK	OK	OK	OK	OK
2	OK	OK	OK	OK	OK	OK
3	OK	OK	OK	OK	OK	OK

Liitteestä 5 löytyvistä kuvaajista näkyy standardien A ja F sekä herkkyiden vaihtelu erien välillä vuosina 2005-2015. Oikeanpuolimmaisista pisteistä ovat karakterisoinnin testierien pisteet. Tulokset ovat kaikissa testeissä hyväksymisrajoissa, joten voidaan todeta, että testattavalla puskurilla pystytään valmistamaan Wallacin laadunvalvontakriteerit täyttäviä leimattuja vasta-aineita.

6.2 Puskurin ja kelaatin välinen reaktio

Testattavan leimauspuskurin ja kelaatin välisen reaktion tulokset ja tulosten tarkastelu löytyy liitteestä 8. Loppupäätelmänä voidaan mainita, että molekyylit reagoivat keskenään hieman, mutta eivät niin paljon, että leimautumisreaktion voitaisiin olettaa häiriintyvän.

6.3 Kombinaatiotestit

Kombinaatiotesteissä tarkkaillaan kontrollien eli QA-kontrollien, tasokalibraattoreiden ja Maternal serum-kontrollien eroa tavoitearvosta. Kullekin kontrollille on määritetty tavoitearvot ja erot tavoitteesta lasketaan pitoisuuksien keskiarvoista. Standardeista tarkkaillaan korjausprosenttia eli sitä, kuinka paljon alkuarvoa on jouduttu korjaamaan. Yhdelmällä tarkoitetaan testattavien komponenttien muodostamaa yhdistelmää. Jokaiselle testille luodaan yhdelmänumero, jonka tiedoista löytyvät muun muassa testattavien komponenttien eränumerot. Liitteestä 10 olevissa kuvioissa on verrattu aiempien tuotannon

yhdelmien tuloksia testiyhdelmistä saatuihin tuloksiin. X-akselilta löytyy yhdelmänumero ja y-akselilta ero tavoitearvosta (target). Testien hyväksymisrajojen ylä- ja alarajat on merkitty kuvioihin mustalla katkoviivalla. Hyväksymisrajoina on käytetty normaaleissa tuotannon testeissä käytettäviä raja-arvoja.

Kontrollien erot tavoitearvosta ovat samaa luokkaa kuin aiemmilla tuotannonyhdelmillä. Lisäksi kaikki tulokset ovat selvästi hyväksymisrajoissa. Standardien korjausprosentit ovat testiyhdelmillä erilaiset verrattuna tuotannon yhdelmiin. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että kombinaatiotesteissä käytetty DELFIA 2-puskurin erä on vaihtunut, eikä sitä ole käytetty vielä muissa testeissä. Puskurin erän on aiemminkin huomattu vaikuttavan standardien korjausprosentteihin (Henkilökohtainen tiedonanto, Susanna Jussila 27.01.2016). Kombinaatiotestien tulokset ovat hyväksymisrajoissa, eivätkä tulokset poikkea normaaleista tuotannoneristä. Testien perusteella voidaan todeta, että karakterisoinnin testierissä valmistetut leimakomponentit toimivat halutulla tavalla yhdessä muiden kittikomponenttien kanssa.

6.4 Säilyvyystestit

Säilyvyystestien tuloksia tarkasteltaessa verrattiin nollapisteen ($T=0$ vrk) tuloksia ja 14 vuorokauden ($T=14$ vrk) tuloksia toisiinsa. Pitoisuuden tavoitearvot ovat kummallakin ajanhetkellä samat. Hyväksymisrajat ovat kiihdytetyissä olosuhteissa säilytetyillä komponenteilla ($T=14$ vrk) hieman löyhemmät kuin nollapisteen testeillä, mikä johtuu siitä, että määritettävien levyjen ja automaattien määrä oli eri. Tavoitearvot ja hyväksymisrajat on Wallacissa määritetty kaikille testeille erikseen, ja samoja arvoja käytettiin näissäkin testeissä.

Säilyvyystestien tulokset hyväksymisrajoihin löytyvät liitteestä 11. Kaikki mitatut pitoisuudet ovat määritettyjen raja-arvojen sisäpuolella ja suhteellisen lähellä tavoitearvoa. Myös standardien ja kontrollien hajonta on huomattavasti hyväksymisrajan alapuolella kummassakin testissä. Kaikki kiihdytetyn säilyvyystestin tulokset ovat siis hyväksymisrajoissa. Tämä osoittaa, että karakterisointitesteissä valmistettu leimaerä täyttää sille asetut vaatimukset säilyvyyden osalta, kun komponentteja säilytetään $+ 4\text{ °C}$:ssa ($+ 2 - + 8\text{ °C}$).

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön tarkoituksena oli karakterisoida PerkinElmer Wallac Oy:n vasta-aineiden leimausprosessia boraattipuskurin korvaamiseksi jollain toisella leimauspuskurilla. Boraattipuskuri haluttiin korvata, sillä sen valmistukseen käytettävät boraatit saattavat heikentää hedelmällisyyttä ja vaurioittaa sikiötä. Aineet ovat työturvallisuudelle riski ja niiden korvaaminen päätettiin aloittaa nyt, sillä Euroopan kemikaalivirasto harkitsee boraattien siirtämistä erityistä huolta aiheuttavien aineiden listalta luvanvaraisten aineiden luetteloon. Työskentelyn tavoitteena oli löytää sopiva puskur ja osoittaa, että se ei muuta valmistettavaa tuotetta. Karakterisoinnin avulla haluttiin kerätä tietoa, jonka avulla pystytään arvioimaan ja suunnittelemaan prosessin uudelleenvalidointitarvetta.

Työ aloitettiin riskiarvioinnilla, jonka perusteella aloitettiin testaus yhdellä boraattipuskurin avulla leimattavista vasta-aineista. Puskurin valinnassa tarkasteltiin pH-aluetta, rakennetta ja työturvallisuusseikkoja. Näiden seikkojen pohjalta valittiin testattavaksi puskur, joka täytti kaikki edellä mainittujen näkökohtien kriteerit. Valitusta puskurista valmistettiin kolme eri koostumuksen omaavaa puskuriliuosta, joista kunkin avulla leimattiin tutkittavaa vasta-ainetta. Puskuriliuokset erosivat toisistaan pitoisuuden ja suolapitoisuuden osalta.

Valmistetuille testierille tehtiin kaikille normaali prosessinaikainen laadunvalvonta sekä kombinaatiotestit ja yhdelle eristä myös kiihdytetty säilyvyystestaus. Laadunvalvonnan perusteella saatiin selville, että vasta-aine leimautuu tehokkaasti, sillä leimausasteet olivat samaa luokkaa kuin normaaleissa tuotannon erissä. Lisäksi mitattavat signaalit olivat halutulla tasolla hyväksymisrajojen sisäpuolella. Kombinaatiotestien avulla tutkittiin, toimivatko valmistetut leimakomponentit yhdessä muiden kittikomponenttien kanssa. Kaikkien testien tulokset olivat hyväksymisrajoissa, eivätkä ne poikenneet aiempien tuotannonerien tuloksista. Tuloksia tarkasteltaessa huomattiin myös, että eri karakterisointierien tulokset eivät eronneet toisistaan eli prosessi ei ole herkkä leimauspuskurin koostumuksen muuttamiselle. Tämän havainnon perusteella lisätesteihin valittiin puskur, jonka koostumus oli lähinnä prosessissa aiemmin käytetyn boraattipuskurin koostumusta. Tämän puskurin avulla leimatulle erälle tehtiin kiihdytetty säilyvyystestaus leimakomponentin säilyvyyden arvioimiseksi. Tulokset olivat hyväksymisrajoissa, mikä tarkoittaa sitä, että leima säilyy normaaleissa säilytysolosuhteissa ainakin sille asetettuun vii-

meiseen käyttöpäivään asti. Nestekromatografi-massaspektrometri-määrityksen tulosten perusteella todettiin, että puskuri reagoi hieman leimaukseen käytettävän kelaatin kanssa. Reaktio oli kuitenkin niin heikko, että sen ei oleteta häiritsevän vasta-aineiden leimautumista, sillä kelaattia on reaktiossa runsaasti ylimäärin. Tulosten perusteella todettiin, että valittu leimauspuskuri toimii prosessissa vaikuttamatta lopputuotteeseen. Leimauspuskuri osallistuu prosessissa vain pH:n säätöön ja se puhdistetaan pois geelikromatografi-laitteistolla ja vaihdetaan säilytyspuskuriin, joten sitä ei ole lopputuotteessa. Säilytyspuskuri pidetään ennallaan. Karakterisoinnin suorittamisesta ja tuloksista laadittiin karakterisointiraportti PerkinElmer Wallac Oy:n ohjeistusten mukaisesti, ja raportti hyväksytettiin validoinninohjausryhmän istunnossa.

Tulosten perusteella päätettiin siirtyä prosessivalidoinnissa seuraavaan vaiheeseen, joka on tässä tapauksessa verifiointi. Verifiointissa tullaan valmistamaan jokaisesta boraattipuskurin avulla valmistettavasta kantaliuoksesta normaalikokoinen tuotantoerä. Kustakin verifiointierästä valmistetaan pienet pullotuserät, joille tehdään kombinaatiotestit ja kiihdytetty säilyvyystestaus. Lisäksi jokaiselle erälle aloitetaan reaaliaikainen säilyvyyssuranta, jonka avulla varmistetaan ja osoitetaan leimakomponenttien säilyvyys. Karakterisointitesteissä testattiin Sigma-Aldrichin valmistamaa puskuria, ja sitä käytetään myös verifiointierien valmistuksessa. Karakterisoinneissa testattu kantaliuos valmistetaan verifiointissa toisen toimittajan puskurilla, sillä kaikilla raaka-aineilla tulee olla myös varatoimittaja. Verifiointista tullaan laatimaan vielä erillinen verifiointisuunnitelma, joka sisältää myös verifiointin aikataulun. Verifiointierissä valmistettavan kantaliuoksen erä koko on huomattavasti suurempi, kuin karakterisointierissä. Lisäksi osoitetaan, että valittu leimauspuskuri toimii myös muiden vasta-aineiden leimauksessa.

Karakterisointi toteutettiin Wallacin menettelyohjeiden ja työohjeiden mukaisesti. Karakterisointierien valmistus tehtiin näiden ohjeiden mukaan ja kaikki käytetyt testausmenetelmät ja niiden hyväksymisrajat olivat yleisesti käytössä olevia. Lisäksi kaikki toiminta dokumentoitiin Wallacin ohjeiden mukaisesti. Näin ollen voidaan todeta, että opinnäytetyössä käytetyt menetelmät olivat hyviä, tulokset luotettavia ja testien toistettavuus hyvä. Opinnäytetyössä saatujen tulosten perusteella toimeksiantaja eli PerkinElmer Wallac Oy voi aloittaa verifiointin boraattipuskurin korvaamiseksi. Tällä tavoin parannetaan työturvallisuutta ja vastataan alati muuttuviin viranomaisvaatimuksiin. Mikäli boraatit siirretään luvanvaraisten aineiden listalle, on Wallac aloittanut toimenpiteet niiden korvaamiseksi tai jopa jo luopunut niistä kokonaan.

LÄHTEET

- ¹ PerkinElmer 2016. Viitattu 19.4.2016
<http://www.perkinelmer.com/fi/corporate/company/about-us/>
- ² Kemikaalivirasto 2014. Viitattu 19.4.2016 <http://www.kemikaalivirasto.fi/Documents/reach/esitteet/lupamenettely.pdf>
- ³ PerkinElmer Wallac Oy, menettelyohje 13905076: Laatukäsikirja
- ⁴ PerkinElmer Wallac Oy, menettelyohje 13903492: Validointipolitiikka ja -menettelyt
- ⁵ U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Process Validation: General Principles and Practices. Tammikuu 2011. Viitattu 15.10.2015 <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM070336.pdf>
- ⁶ Euroopan kemikaalivirasto. Tietoa meistä. Viitattu 7.9.2015 <http://echa.europa.eu/fi/about-us>
- ⁷ Euroopan kemikaalivirasto. ECHAN palvelut lyhyesti. Viitattu 7.9.2015
http://echa.europa.eu/documents/10162/13556/echa_services_leaflet_en.pdf
- ⁸ Euroopan kemikaalivirasto. REACH-asetus tutuksi. Viitattu 7.9.2015
<http://echa.europa.eu/fi/regulations/reach/understanding-reach>
- ⁹ Euroopan kemikaalivirasto. Kandidaattilista. Viitattu 7.9.2015
<http://echa.europa.eu/fi/regulations/reach/authorisation/the-candidate-list>
- ¹⁰ Euroopan kemikaalivirasto. Lupamenettely. Viitattu 7.9.2015
<http://echa.europa.eu/fi/regulations/reach/authorisation>
- ¹¹ Ahvensalmi, A. 2015. Kemikaalien käyttäjä, tutustu lupamenettelyyn. Kemia 6/2015, s. 36.
- ¹² Euroopan kemikaalivirasto 2016. Ehdokasluettelo erityistä huolta aiheuttavista aineista lupamenettelyä varten. Viitattu 22.2.2016
<http://echa.europa.eu/fi/candidate-list-table/-/dislist/details/0b0236e1807d9481>
- ¹³ Euroopan kemikaalivirasto 2016. Viitattu 22.2.2016 Erityistä huolta aiheuttavien aineiden ehdokasluettelo, Boorihappo.
<http://echa.europa.eu/fi/candidate-list-table/-/dislist/details/0b0236e1807d9b69>
- ¹⁴ Hemmilä, I.; Mottram, P. & Ståhlberg, T. 1994. Bioanalytical applications of labelling technologies. 2., uudistettu painos. Wallac, an EG&G company.
- ¹⁵ PerkinElmer 2015. Viitattu 18.1.2016.
Time-resolved fluorometry:
<http://www.perkinelmer.com/fi/pages/030/nbs/methods/time-resolved-fluorometry.xhtml>
Immunoassay:
<http://www.perkinelmer.com/fi/pages/030/nbs/methods/immunoassay.xhtml>
- ¹⁶ Hemmilä, I. 1995. Luminescent lanthanide chelates – a way to more sensitive diagnostic methods. Journal of Alloys and Compounds 225 (1995), s. 480-485
- ¹⁷ Johnstone, A.P. & Turner, M.W. 1997. Immunochemistry 1, A practical approach. New York: Oxford University Press Inc.

-
- ¹⁸ Solunetti 2006. Vasta-aineet. Viitattu 5.4.2016 <http://www.solunetti.fi/fi/histologia/vasta-aineet/>
- ¹⁹ PennState Eberly College of Science. Viitattu 11.3.2016
https://online.science.psu.edu/micrb106_wd/node/6160 luettu
- ²⁰ PerkinElmer Wallac Oy, perehdytysmateriaali. Luettu 27.11.2015
- ²¹ Haajanen, K.; Pärssinen, R. & Suominen, I. 2012. Biogeeni. Ammatillista biokemiaa ja geotekniikkaa. Tampere: Opetushallitus.
- ²² PerkinElmer Wallac Oy, menettelyohje 13901122: Leimavalmistuksen yleiset menettelyt
- ²³ PerkinElmer Wallac Oy, menettelyohje 13903645: Reagenssien valmistus kemian tuotannossa
- ²⁴ Bollag, D.M.; Edelstein, S.J. & Rozycki, M.D. 1996. Protein Methods, 2nd Edition. New York: Wiley-Liss, Inc.
- ²⁵ Braithwaite, A. & Smith, F.J. 1999. Chromatographic Methods. 5th Edition. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- ²⁶ PerkinElmer Wallac Oy, menettelyohje 13901616: Kromatografialaitteistojen käyttöohje
- ²⁷ Niessen, W.M.A. 1999. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. 2nd Edition, Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker, Inc.
- ²⁸ Opetushallitus 2016. Viitattu 1.3.2016. http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_5-5_massaspektrometria.html
- ²⁹ PerkinElmer Wallac Oy, menettelyohje 13804252: Loppulaadunvalvonta
- ³⁰ PerkinElmer Wallac Oy, menettelyohje 13905993: IVD-reagenssien säilyvyytestauskäytännöt kiihdytetyissä tutkimuksissa

Riskiarviointi

Luottamuksellinen tieto

Puskurin valinta

Luottamuksellinen tieto

Puskuriliuosten valmistus

Luottamuksellinen tieto

Kantaliuosten valmistus ja pullotus

Luottamuksellinen tieto

Prosessinaikaisen laadunvalvonnan tulokset hyväksymisrajoineen

Luottamuksellinen tieto

UPLC-MS-määritys

Luottamuksellinen tieto

UPLC-MS-määrityksen raakadata

Luottamuksellinen tieto

UPLC-MS-määrityksen tulosten tarkastelu

Luottamuksellinen tieto

Eu-N¹-ITC-kelaatin UV-spektri

Luottamuksellinen tieto

Kombinaatiotestien tulokset hyväksymisrajoineen

Luottamuksellinen tieto

Säilyvyystestien tulokset hyväksymisrajoineen

Luottamuksellinen tieto